

Aus der Medizinischen Klinik
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. H. A. Kühn

Bestimmung des Blutammoniaks
Vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung
des Blutammoniaks mit zwei im Analysengang
unterschiedlichen Methoden

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Renate Lauer
aus Kassel

Gießen 1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. H. A. Kühn

Bestimmung des Blutammoniaks
Vergleichende Untersuchungen zur Bestimmung
des Blutammoniaks mit zwei im Analysengang
unterschiedlichen Methoden

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Renate Lauer
aus Kassel

Gießen 1969



Dekan: Prof. Dr. E. Habermann

Referent: Prof. Dr. H. A. Kühn

Korreferent: Prof. Dr. O. Grüner

INHALT

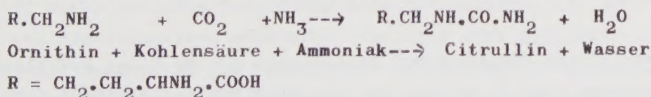
	Seite
A. Ammoniakstoffwechsel und Problemstellung	5
B. I. Methodik	9
1. Pathologische Ammoniakwerte und ihre klinische Bedeutung	9
2. Methoden zur Ammoniakbestimmung in eiweißhaltigen Lösungen	11
3. Gemeinsame Schwierigkeiten der Blutammoniakbestimmungen	18
4. Auswahl der Methoden	23
II. Eigene Untersuchungen	27
1. Ionenaustauschermethode mit den Hyland Testreagenzien	27
a) Prinzip	27
b) Untersuchungsmaterial	27
c) Durchführung	29
d) Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Farbentwicklung	32
e) Standardeckurven	33
f) Normalwerte	36
g) Wiederfindung	37
2. Direktbestimmungsmethode	39
a) Prinzip	39
b) Untersuchungsmaterial	39
c) Durchführung	39
d) Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Farbentwicklung	41
e) Standardeckurven	43
f) Normalwerte	45
g) Wiederfindung	46
C. Diskussion	48
1. Spezifität	48
2. Schwierigkeitsgrad	54
3. Chemikalienunkosten und apparativer Aufwand	54
4. Zeitbedarf	55
5. Richtigkeit	55
D. Zusammenfassung	60

Ammoniakstoffwechsel und Problemstellung

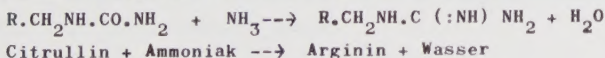
Genauso wie das Kohlendioxyd im menschlichen Organismus das Resultat sämtlicher Dekarboxylierungen ist, ist das Ammoniak Ergebnis aller oxydativen Desaminierungen der Aminosäuren und ein Endprodukt intermediärer Stoffwechselvorgänge. Durch die Entdeckung der Aminosäureoxydasen durch KREBS (19) im Jahr 1932 war eine Lücke in der Kenntnis biochemischer Vorgänge geschlossen. Bereits ein Jahr zuvor hatte KREBS zusammen mit HENSELEIT (20) einen Entgiftungsmechanismus des Ammoniaks durch die genaue Aufklärung der Harnstoffsynthese klären können. Damit war die These, die LÖFFLER (23) 1918 aufstellte "Harnstoff ist entgiftetes Ammoniak", voll bewiesen und biochemisch untermauert. Auch über den Ort der Harnstoffbildung bestand Klarheit. Schon 1882 konnte SCHRÖDER (39) mit Durchströmungsversuchen nachweisen, daß in der Leber Ammoniaksalze in Harnstoff überführt werden. KREBS (19) bestätigte dieses Ergebnis an Leberschnitten und wies zusätzlich an Organschnitten, die er in Ammoniumsalslösung legte und verbrauchtes Ammoniak sowie neu gebildeten Harnstoff bestimmte, nach, daß die Harnstoffbildung anderer Organe minimal ist. Sie liegt entsprechend seinen Versuchen um das Hundertfache unter der Harnstoffbildung der Leber.

Im einzelnen läuft die Harnstoffbildung in einem Kreislauf biochemischer Reaktionen ab, bei denen das Ornithin ähnlich einem Katalysator die führende Rolle spielt:

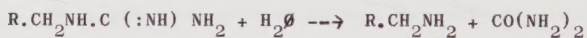
- a. Anlagerung von Kohlensäure und Ammoniak an Ornithin unter Bildung von Citrullin bei Austritt von einem Molekül Wasser:



- b. An Citrullin wird unter Wasseraustritt ein zweites Molekül Ammoniak angelagert, wobei Arginin entsteht:

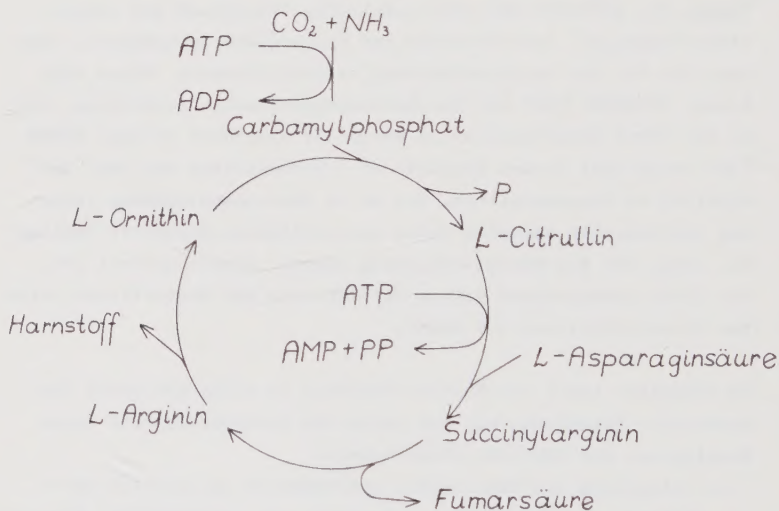


c. Arginin zerfällt unter Wirkung der Arginase in Ornithin und Harnstoff:

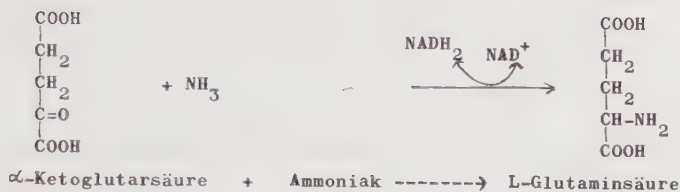


Arginin + Wasser $\longrightarrow$ Ornithin und Harnstoff.

Stellt man diese drei Stufen der Ammoniakentgiftung zusammenfassend im Harnstoffzyklus dar, so sieht man, daß zwei Stufen des Harnstoffzyklus, die Carbamyl-phosphat-Synthese und die Succinyl-Arginin-Synthese obligatorisch je ein Molekül ATP verbrauchen (37).



Neben diesem Hauptweg der Entgiftung, der 80 % des anfallenden Ammoniaks bindet, wurde 1957 von SELIGSON und HIRAHARA (40) ein Nebenweg beschrieben, der durch Bindung von zwei Molekülen Ammoniak an α -Ketoglutaratsäure zu Glutamin führt:



Während das Ammoniak als giftiges Intermediärstoffwechselprodukt der entgiftenden Funktion der Leber anheim fällt, spielt es in der Niere eine wichtige Rolle zur Regulierung des Säure-Basen-haushaltes des Organismus. Durch die Fähigkeit der Niere zur Ammoniakproduktion können die als Natriumsalze der Niere zugeführten differenten Säuren durch Überführen in Ammoniumsalze natriumsparend ausgeschieden werden. Diese Seite des Ammoniakstoffwechsels berührt aber nicht die in dieser Arbeit im Hintergrund stehenden klinischen Probleme der Ammoniakintoxikation, die trotz Klarheit über die Biochemie der Ammoniakentgiftung letztlich noch nicht befriedigend gelöst sind.

Die erste Beobachtung in diesem Rahmen machten HAHN, MASSEN, NENCKI und PAWLOW 1893 (13) an Hunden mit Eck'scher Fistel, bei denen sich ein eigentümliches Vergiftungsbild entwickelte, das durch Gaben von Ammoniumsalzen verstärkt oder auch erst ausgelöst werden konnte. Sie vermuteten als Ursache der Vergiftung das Ammoniak. Seit dieser Zeit haben sich klinische Arbeiten mit wechselnder Akzentuierung diesem Problem gewidmet, das durch die Entwicklung operativer Methoden zur Behandlung des Pfortaderhochdrucks in jüngster Zeit wieder aktuell wurde.

Grundlage aller klinischen Forschung zu dieser Problematik ist, eine Bestimmungsmethode für Ammoniak zu finden, die spezifisch, störunanfällig und labortechnisch leicht durchführbar ist.

Es soll daher in dieser Arbeit eine von MÜLLER - BEISSENHIRTZ und KELLER (28) angegebene Methode zur Ammoniakbestimmung in dieser Hinsicht geprüft werden. Als Vergleich wurde eine Methode herangezogen, bei der Ammoniak selektiv an ein Ionenaustauscherharz gebunden wird.

Pathologische Ammoniakwerte und ihre klinische Bedeutung

Unter physiologischen Bedingungen entsteht Ammoniak an mehreren Orten im Organismus (12).

- a. In der Niere zur Regulierung des Säure- Basenhaushaltes
- b. In jeder Körperzelle beim Abbau von Aminosäuren und anderen stickstoffhaltigen Substanzen
- c. Im Intestinaltrakt durch bakterielle Zersetzung der Nahrungseiweiße und des in den Verdauungstrakt diffundierenden Blutharnstoffs.

Mengenmäßig spielt die Ammoniakbildung im Intestinaltrakt durch Bakterien, die als wirksame Enzyme Desaminasen oder Urease produzieren, die größte Rolle (35). Das im Verdauungstrakt gebildete Ammoniak wird über die Pfortader der Leber zur Entgiftung im Harnstoffzyklus zugeführt (21b). So enthält Pfortaderblut unter normalen Bedingungen ungefähr achtmal so viel Ammoniak wie peripheres Blut (25).

Gelangt das Blut nach porto-cavalen Shunt-Operationen unter Umgehung der Leber direkt von der Pfortader in den großen Kreislauf, so läßt sich dort, mehr im arteriellen als im venösen Blut ein erhöhter Blutammoniakspiegel messen. Die Erhöhung des Blutammoniakspiegels bei Leberzirrhose (4, 45), bei primärem Leberneoplasma und Metastasenleber (35) und Leberausfallkoma (8, 11a, 15, 25) hat die gleiche Ursache: während der Umbauprozesse des Leberparenchyms werden porto-cavale Kollateralen eröffnet, über die ein Teil des Pfortaderblutes unter Umgehung der Leber direkt in die Vena cava gelangt. Beim Cor pulmonale (36) bewirkt die Stauung in der Vena cava eine Eröffnung porto-cavaler Anastomosen und dadurch einen erhöhten Ammoniakspiegel im großen Kreislauf. MARTINI und WIEBEL (26) fanden eine Erhöhung des venösen Blutammoniakspiegels bei Ösophagusvarizen und setzten seine Bestimmung bei der Differentialdiagnose akuter Blutungen im oberen Verdauungskanal ein, wenn nicht zu entscheiden war, ob eine Blutung aus einem Ulkus oder aus Ösophagus-Varizen vorlag. Sie fanden 5 - 16 Stunden nach Einsetzen der Blutung bei Patienten

mit nachgewiesenen Ösophagus-Varizen Blutammoniakwerte von 118 bis 143 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ im Gegensatz zu Werten von 52 bis 77 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ bei Patienten mit Blutungen aus dem oberen Teil des Verdauungstraktes ohne nachweisbare Ösophagus-Varizen. Blutungen aus Ösophagus-Varizen sind meist eine Folge fortgeschrittener Leberzirrhose. Das plötzlich anfallende Bluteiweiß und der Blutharnstoff werden durch Darmbakterien abgebaut, es strömt vermehrt Ammoniak der Leber zu und gelangt von dort in den großen Kreislauf. Bei Ulkusblutungen sind dagegen die porto-cavalen Anastomosen geschlossen, und die intakte Leber kann das plötzlich anfallende Ammoniak im Harnstoffzyklus binden.

Eine weitere Bedeutung hat die Ammoniakbestimmung im Ammonium-Toleranztest gewonnen, der Aufschluß über das Vorliegen hämodynamisch kaum relevanter porto-cavalen Anastomosen gibt. Der Ammonium-Toleranztest wird mit Ammoniumsalzen (4, 43, 45), Eiweiß (34), Blut, Plasma oder kompakten Zellen (2) durchgeführt. STROHMEYER (45) und STAHL (43) beobachteten bei gesunden Versuchspersonen während dieses Tests unerhebliche Konzentrationsänderungen des venösen Blutammoniaks innerhalb des Normalbereichs, während CASTELL (4) im arteriellen Blut der Kontrollpersonen einen geringen Anstieg über die Norm fand mit einem Maximum 30 Minuten nach oraler Einnahme von 5g Ammoniumacetat. Alle drei Autoren beobachteten dagegen eine starke Zunahme des Ammoniakspiegels im venösen und arteriellen Blut bei Patienten mit Leberzirrhose oder extrahepatischer Pfortaderblockade. Weitere Untersuchungen hierzu führten ORLOFF und Mitarbeiter (34) aus. Sie zeigten an Versuchen mit Hunden, denen sie porto-cavale End-zu-Seit-Anastomosen verschiedener Größe anlegten, daß die Höhe des peripheren Blutammoniakspiegels in direkter Beziehung zur Durchflußrate durch den Shunt steht. Die Blutammoniakwerte lagen bei Shuntdurchmessern von 2,0 bis 4,2 cm deutlich höher als bei kleineren Shuntdurchmessern von 0,38 bis 1,8 cm.

Die schwerste Form der Ammoniakintoxikation äußert sich klinisch im Coma hepaticum in neurologischen und psychischen Störungen. Beim hepatischen Koma lassen sich drei Formen unterscheiden (14):

- a. Das endogene Koma bei Leberzellzerfall (= Leberzerfalls-koma)
- b. Das exogene Koma bei Leberausfall mit erhöhtem Blut-ammoniak (= Leberausfallkoma)
- c. Das exogene Koma bei Leberausfall ohne erhöhtes Blut-ammoniak (= Elektrolytkoma).

Da die Bewußtseinstrübung des Elektrolytkomas durch Hypoosmolarität mit Hypokaliämie und Hyponatriämie hervorgerufen wird, soll in dieser Arbeit nicht näher darauf eingegangen werden.

Den beiden ersten Formen des Coma hepaticum ist die fehlende Überführung des Ammoniaks des Portalvenenblutes in Harnstoff durch die Leber gemeinsam. In beiden Fällen ist der Ammoniakspiegel des peripheren Blutes stark erhöht, beim Zerfallskoma im Endstadium, beim Ausfallkoma sofort, weswegen vermutet wird, daß über längere Zeit erhöhtes Blutammoniak auf die Nervenzellen, wahrscheinlich aber auch auf die übrigen Körperzellen toxisch wirkt. Der Eintritt in diese Zellen beruht auf der guten Diffusionsfähigkeit des Ammoniaks in seiner nicht ionisierten Form (12). Da die Erhöhung des Blutammoniakspiegels nicht immer parallel mit der Schwere des Komas läuft, müssen noch andere auslösende Faktoren für das Zustandekommen des Coma hepaticum angenommen werden.

Für das Entstehen des endogenen Komats, das vor allem nach Virushepatitis, Serumhepatitis sowie bei Intoxikationen mit hepatotoxischen Stoffen auftritt, gilt heute folgende Hypothese (11b): Durch den Zerfall der Leberzellen werden giftige Substanzen, unter anderem auch Ammoniak, freigesetzt, die zum Teil in das Gehirn gelangen, zum Teil direkt mit der Galle in den Darm ausgeschieden werden. Durch Rückresorption gelangen sie über den entero-hepatischen Kreislauf wieder zu der entgiftungsinsuffizienten Leber (11b).

Als Grundkrankheiten des Leberausfallkomats kommen Leberzirrhosen verschiedener Ätiologie infrage. Zu hohe Eiweißzufuhr mit der Nahrung, Blutungen aus Ösophagusvarizen und den bei Zirrhose-

kranken relativ häufig vorkommenden Ulcera duodeni und ventriculi (29) stellen die auslösenden Faktoren dieser Komaform dar.

Therapeutisch stehen daher beim Ammoniakkoma folgende Maßnahmen im Vordergrund:

- a. Beseitigung der auslösenden Faktoren (zB. Blutungen aus Ösophagusvarizen und Ulzera, Methionin per os, Ammoniumchlorid, zu hohe Eiweißzufuhr)
- b. Intensives Abführen mit hohen Einläufen zur schnellen Entfernung toxisch wirkender Eiweißabbauprodukte aus dem Darm (zB. Blut aus Ösophagusvarizen, Magen- oder Duodenalulzera)
- c. Eiweißfreie Dauertropf- oder Duodenalsondenernährung mit Glukose und Laevulose, deren aminosäuresparender und blut-ammoniaksenkender Effekt nachgewiesen worden ist
- d. Orale Gabe von Antibiotika mit breitem Wirkungsspektrum, die vom Magen- Darmkanal nicht resorbiert werden und widerstandsfähig gegen Verdauungsfermente sind, um die Darmflora zu vermindern und ihre eiweißspaltende Wirkung zu verhindern. Am besten bewährt hat sich Neomycin (25,30).
- e) Senkung des Ammoniakspiegels und anderer toxischer Eiweißabbauprodukte im Blut durch Substanzen, die die Ammoniakentgiftung fördern. Bewährt haben sich Kombinationspräparate aus Arginin und Äpfelsäure (21a). Auf die Wirkungsweise dieser Substanzen soll anschließend eingegangen werden.
- f. Kontrolle des Elektrolythaushaltes, insbesondere des Kaliumspiegels im Serum.
- g. Gaben von Prednison bei Leberausfallkoma nach Virushepatitis (22).

Wiederholte Bestimmungen der Blutammoniakwerte bei der unter Punkt c bis e angeführten Therapie sollen ein guter Maßstab für den Erfolg der Behandlung sein (29).

Wirkungsweise der in den Ammoniakstoffwechsel eingreifenden Substanzen:

Arginin nimmt an der Ammoniakentgiftung im Harnstoffzyklus teil,

wobei seine biochemische Wirkung noch nicht vollständig geklärt ist. Es mag einen Mangel an Substrat im Harnstoffzyklus korrigieren oder die Aktivität der Enzyme, die während dieses Zyklus wirken, erhöhen (32).

Die Äpfelsäure greift in den zweiten Weg der Ammoniakentgiftung über α -Ketoglutarsäure zu Glutamin ein. Ihre Wirkung kann nach NORDMANN (32) in folgenden drei Reaktionsschritten erklärt werden.

Zuerst wird die Äpfelsäure durch die Malat-Dehydrogenase zu Oxal-essigsäure oxydiert, dabei wird NADH_2 produziert. In der zweiten Reaktion reagiert Oxal-essigsäure mit Glutaminsäure unter dem Einfluß der Glutamat- Oxalat- Transaminase, um Asparaginsäure und α -Ketoglutarsäure zu bilden. In der dritten Reaktion werden unter Katalysatorwirkung von Glutamat- Dehydrogenase aus α -Ketoglutarsäure, NADH_2 und Ammoniak Glutaminsäure und NAD^+ gebildet, wobei das Ammoniak entgiftet wird. Die Glutaminsäure kann wieder für die zweite Reaktion verwandt werden, während NAD^+ erneut in die erste Reaktion eingreift. Die Bilanz dieser drei Reaktionen ist durch die Bildung von Asparaginsäure und Wasser aus Äpfelsäure und Ammoniak repräsentiert. Ein Teil der zugeführten Äpfelsäure wird nicht für die Ammoniakentgiftung verbraucht, sondern wirkt direkt auf den Trikarbonsäurezyklus und kann so den Mangel an ATP korrigieren, der bei gestörter Leberfunktion immer vorliegt (32). Die Äpfelsäure- Arginin-Kombination fördert somit beide Wege der physiologischen Ammoniakentgiftung.

Methoden zur Ammoniakbestimmung in eiweißhaltigen Lösungen

Anhand der klinischen Bedeutung sollte die Wichtigkeit und der augenblickliche Indikationsbereich der Blutammoniakbestimmung dargestellt werden. Voraussetzung für die Aussagekraft der Blutammoniakwerte ist allerdings die Kenntnis des physiologischen Blutammoniakgehalts und dessen Streuungsbereich. Darüber besteht heute noch keine eindeutige Klarheit. CONWAY (6) bezweifelt das Vorhandensein von Ammoniak im s t r ö m e n d e n Blut. Im Gegensatz dazu finden alle Untersucher des Blutammoniaks n a c h der Blutabnahme meßbare Ammoniakwerte, die bei längerem Stehen der Blutprobe rasch ansteigen.

Zur Blutammoniakbestimmung sind von verschiedenen Autoren im Analysengang unterschiedliche Methoden vorgeschlagen worden, von denen einige in Tabelle 1 angeführt sind. Die Normalwerte schwanken von Methode zu Methode, so daß bei Angabe der Blutammoniakwerte immer auch das Bestimmungsverfahren angeführt werden sollte. Die meisten Methoden sind in der Durchführung langwierig und apparativ aufwendig. Von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER (28) wurde zur Bestimmung des Blutammoniaks eine Methode angegeben, die der Forderung einer Routinemethode entspricht: einfaches Erlernen, geringe Fehlerquellen, relativ geringer Zeitaufwand und geringe Materialkosten. Sie scheint daher im Hinblick auf die Vielzahl der anderen Methoden augenblicklich einer Ideallösung zu entsprechen. Größere Vergleichsuntersuchungen mit den anderen Methoden liegen aber noch nicht vor, so daß nicht entschieden werden konnte, ob sie auch hinsichtlich der Ergebnisse für den routinemäßigen Einsatz den klinischen Anforderungen entspricht. Es soll daher in der folgenden Untersuchung geklärt werden, ob die Ergebnisse mit denen einer Methode vergleichbar sind, die vom Analysengang her störunanfällig ist und somit als Maßstab dienen kann.

Prinzipiell sind folgende Bestimmungsmethoden angegeben worden (Tabelle 1).

A. Verfahren, die das Ammoniak nach Austreiben in einer Vorlage bestimmen.

Zur Isolierung werden angewandt:

- a. Destillationsmethoden, meist zurückgehend auf PARNAS und HELLER (46, 49)
- b. Aerationsverfahren (42)
- c. Diffusionsmethoden (31, 41, 44, 47, 51)

B. Verfahren, bei denen Ammoniak an Ionenaustauscher adsorbiert und dann nach Elution bestimmt wird (9, 15)

C. Verfahren, womit das Ammoniak ohne vorherige Isolierung direkt in der Probe bestimmt wird (17, 28)

Das Prinzip aller drei unter A angeführten Methoden besteht darin, Ammoniak durch Alkalisieren aus dem Blut auszutreiben und in einer Vorlage aufzufangen. Das Prinzip der Mikrodiffusionsanalyse nach CONWAY (A.c), die relativ weite Verbreitung gefunden hat, ähnelt dem der Destillation (A.a). Bei der Destillationsmethode werden die Ammoniakmoleküle des Blutes durch einen Temperaturgradienten (mit oder ohne Dampfstrom) in die Vorlage gebracht, während sie bei der Methode nach CONWAY (6) in die Vorlage diffundieren. Dort werden sie gebunden oder chemisch so verändert, daß sie keinen nennenswerten Gasdruck mehr ausüben. Durch das so entstehende Konzentrationsgefälle diffundieren dauernd neue Moleküle, bis schließlich alle in der Vorlage gebunden und isoliert sind (52).

Für die Bestimmung des isolierten Ammoniaks sind folgende Verfahren beschrieben worden:

- 1. Rücktitration mit Säure (52)
- 2. Colorimetrie nach Farbreaktion mit
 - a. Nessler's Reagens (40)
 - b. reduziertem Ninhydrin (31)
 - c. Phenol-Hypochlorit-Reagens (Berthelotsche Reaktion) (45,47,51)
 - d. Hypobromit-Phenosaaphranin-Reaktion (Sonessches Verfahren) (44)

- e. Pyrazol-Reagens unter Bildung von Rubazosäure (1)
- f. J. REARDON et al. (38) beschreiben eine weitere Farbreaktion, bei der Natriumsalicylat und Natriumchloroisocyanurat unter Katalysatorwirkung von Natriumnitroprussid mit Ammoniak einen grünen Farbstoff ergeben. Mitteilungen über die Anwendbarkeit in biologischem Material liegen noch nicht vor.

Die Ionenaustauschermethode (B) beruht auf folgendem Prinzip: das zum größten Teil in Ionenform vorliegende Ammoniak des Blutes wird elektiv an ein mit Natriumionen gesättigtes Austauscherharz adsorbiert und dabei gegen die Natriumionen ausgetauscht. Zur Bestimmung werden folgende Austauscherharze benutzt: Dowex 50 W by 12,200 to 400 mesh, sulfonic acid type (15) oder Ion-exchange resin Amberlite C.G. 120,100 to 200 mesh (B.D.H.), neutral (9) oder Hyland Test-Resin (für die eigenen Untersuchungen).

Nachdem die Ammoniakionen quantitativ gegen die Natriumionen ausgetauscht und an das Harz adsorbiert sind, wird das Harz durch wiederholtes Waschen und Absaugen vom Blutplasma und damit von allen etwaig vorhandenen Störfaktoren gereinigt. Zu dem trockenen Harz, an das die Ammoniakionen adsorbiert sind, wird im Überschuß Natriumchlorid hinzugegeben, so daß nun wieder die Natriumionen gegen die Ammoniakionen ausgetauscht werden und sich lediglich Ammoniakionen in dem Überstand befinden.

Die Bestimmung des Ammoniaks im Eluat wird colorimetrisch durchgeführt und zwar mit

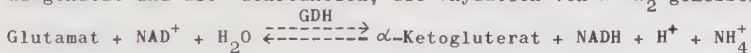
- a. Nessler's Reagens (7, 15)
- b. Phenol-Hypochloritreagens (9, 10, 27)

Bei der Direktbestimmungsmethode (C) wird das Eiweiß des Vollbluts mit Trichloressigsäure oder Trichloressigsäurelösung, die zur Hälfte als Natriumsalz vorliegt (16) gefällt, das Blut anschließend zentrifugiert. In dem TCE-Extrakt kann das Ammoniak

- a. mittels der Phenol-Hypochloritreaktion (16, 18, 28) oder
- b. auf enzymatischem Wege bestimmt werden (17).

Bei der Phenol-Hypochloritreaktion bildet Ammoniak mit Phenol und Hypochlorit unter Katalysatorwirkung von Natriumnitroprussid einen blauen Farbstoff vom Typ der Indophenole. Die Intensität des gebildeten Farbstoffs ist der Menge des Ammoniaks direkt proportional und wird photometrisch bestimmt.

Zur enzymatischen Bestimmungsmethode wird die oxydative Desaminierung der Glutaminsäure durch Glutaminsäuredehydrogenase ausgenutzt und die Rückreaktion, die Oxydation von NADH_2 gemessen:



Gemeinsame Schwierigkeiten der Blutammoniakbestimmung

Im strömenden Blut befindet sich Ammoniak zum größten Teil in ionisierter (NH_4^+), zu ganz geringem Prozentsatz in gasförmiger Form (NH_3). Das Verhältnis des gelösten Ammoniaks zu dem freien, das den Ammoniakpartialdruck des Blutes erzeugt, läßt sich in Abhängigkeit von dem Blut pH-Wert an einem Nogramm ablesen (24).

Das freie Ammoniak passiert die Zellmembranen schneller als das gelöste Ammoniakion. Es ist daher wahrscheinlich, daß die nicht-ionisierte Form den toxischen Faktor bei Patienten mit Leberschaden darstellt (50).

Nach der Blutabnahme werden zwei Ammoniakfraktionen unterschieden (48):

1. Ammoniak, das bei sofortiger Bestimmung messbar ist (also das ionisierte und gasförmige) und
2. Ammoniak, das durch Spaltung der Aminosäuren und anderer stickstoffhaltiger Substanzen entsteht und zwar durch
 - a. alkalische Hydrolyse und bei Benutzung entsprechender Testreagenzien auch durch saure Hydrolyse
 - b. Enzymaktivität

Das Ziel aller Ammoniakbestimmungsmethoden ist, nur die Fraktion 1 zu bestimmen, da die Fraktion 2 artifiziell ist.

Die ~~Abspaltung~~ Abspaltung des Ammoniaks von Proteinen und Aminen (Fraktion 2) ist in Kälte gering, da durch sie die chemischen und enzymatischen Vorgänge gehemmt werden.

So wird bei allen Methoden Blut, das nicht sofort nach Entnahme bestimmt werden kann, bis zur Bestimmung in einem Eis-Wasser-Gemisch aufbewahrt.

Allerdings darf die Wartezeit nur maximal 15 bis 40 Minuten nach der Blutabnahme dauern. Während dieser Zeit bleiben die Blutammoniakkonzentrationen konstant, danach steigen sie durch Hydrolyse und Enzymaktivität ständig an. Soll Blut bis zur Bestimmung

längere Zeit aufbewahrt werden, so muß es eingefroren werden. Bei der Gefriermethode von CONN und KULJIAN (5) bei minus 15⁰C in flüssigem Stickstoff oder Äthanol-Trockeneis zeigte der Blutammoniakspiegel bei Gefrierdauer bis zu 4 Tagen keinen signifikanten Anstieg, wenn das Blutammoniak sofort nach dem Auftauen bestimmt wurde.

Um die alkalische und saure Hydrolyse sowie die enzymatische Desaminierung auf einem Minimum zu halten, ist ein schneller Analysengang notwendig. So zeigte sich bei PEREA und NELSON (35), die eine von McDERMOTT et al. modifizierte Mikrodiffusionsmethode nach CONWAY zur Bestimmung des Blutammoniaks benutzten, daß bei 60-minütiger Diffusionsdauer die Werte aller untersuchten Proben höher lagen als bei 10-minütiger Diffusionsdauer. Dies muß allerdings nicht unbedingt auf die stattgefundene Hydrolyse zurückgeführt werden, denn bei KONITZER und VOIGT (18) ergaben mit verschiedenen eigenen Diffusionsgefäßen ermittelte Kinetiken von Ammoniakstandards und Trichloressigsäureextrakten aus Blut und Gewebe mit Sicherheit die Beendigung der Diffusion des freigesetzten Ammoniaks erst 120 Minuten nach Zugabe der Alkalilösung. Für diese - im Vergleich zu den Mitteilungen anderer Untersucher - längeren Diffusionszeiten ist ein Gefäßfaktor nicht verantwortlich zu machen, da die Diffusionskinetiken bei beiden Gefäßtypen gleich waren (18).

Bei allen Bestimmungsverfahren, die entweder das Ammoniak nach Austreiben aus einer Vorlage bestimmen oder Ammoniak an einen Ionenaustauscher adsorbieren und anschließend im Eluat nachweisen, muß also die Zeit bis zur völligen Isolation des Ammoniaks möglichst gering sein.

Bei den Mikrodiffusionsmethoden (Gruppe A, Tabelle 1) reichen die von verschiedenen Autoren angewandten Diffusionszeiten von 15 Minuten (45) bis zu 2 Stunden (52), wobei die häufigsten Bestimmungen mit einer Diffusionsdauer von 30 Minuten durchgeführt werden (31, 41, 47, 51).

Bei der Ionenaustauschermethode (Gruppe B, Tabelle 1) ist die Zeit bis zur Beendigung des Waschvorgangs vergleichbar mit der Diffusionszeit der Mikrodiffusionsmethoden. In dieser Zeit werden sämtliche NH_4^+ -Ionen entweder selektiv adsorbiert oder gebunden. Sie beträgt bei HUTCHINSON und LABBY (15) ungefähr 10 Minuten, ebenso bei der Ionenaustauschermethode mit den Hyland Blutammoniak Testreagenzien und bei FENTON (9) 15 Minuten. FENTON führt allerdings die Ammoniakadsorption an das Harz in einem Apparat durch, dessen Mantel durch Eis gekühlt wird, und arbeitet mit neutralem Ionenaustauscherharz, so daß während dieser Zeit praktisch weder eine Hydrolyse noch eine enzymatische Abspaltung stattfinden kann.

Zu den oben angeführten Bestimmungszeiten müssen bei beiden Methoden noch 10 Minuten für das Zentrifugieren addiert werden.

Bei den Verfahren, die Ammoniak ohne vorherige Isolierung direkt in der Probe bestimmen (Gruppe C, Tabelle 1), ist die Zeit bis zur völligen Isolierung des Ammoniaks bei der Diffusions- und der Ionenaustauschermethode vergleichbar mit der Zeit bis zum vollständig abgeschlossenen Analysengang. Denn während des gesamten Analysengangs befinden sich noch Aminosäuren und Harnstoff im Untersuchungsmaterial. Diese können weiter durch Hydrolyse und auf enzymatischem Weg Ammoniak abspalten. Die Ammoniakbestimmungsmethode von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER (28) dauert bis zur abgeschlossenen Analyse 40 bis 50 Minuten; die enzymatische Bestimmungsmethode (17) benötigt ungefähr 30 Minuten. Die Zeiten dieser beiden Direktbestimmungsmethoden überschreiten die der Mikrodiffusionsmethoden nicht und die der Harzaustauschermethoden nicht wesentlich. Sie liegen außerdem in dem von CONN und KULJIAN (5) angegebenen konstanten Bereich der Ammoniakkonzentrationen.

Beide Ammoniakbestimmungsmethoden weisen den Ammoniakgehalt des Blutes im TCE- oder im TCE-Na-Extrakt nach, so daß der durch die saure Hydrolyse bedingte Fehler die Spezifität beider Methoden gleichermaßen einschränkt (28). Allerdings ist bei der enzymati-

tischen Methode die Anwesenheit von Amiden kein zusätzlicher Störfaktor, während bei den Direktbestimmungsmethoden nach MÜLLER - BEISSENHIRTZ und KELLER (28) Aminosäuren bei der Bildung des Irdophenols mit dem Ammoniak interferieren (43), wenn sie im Vergleich zur Ammoniakkonzentration in hoher Konzentration vorliegen.

Tabelle 1, Übersicht der einzelnen Bestimmungsmethoden

Nr.	Methode	NH ₃ -Isolation durch	NH ₃ -Bestimmung	Zeit) ^x /Min.	Mögliche Störfaktoren
A	Austreiben und Auffangen in Vorlage	Destillation	Rücktitration mit Säure		
		Aeration	Colorimetrie nach Farbreaktion mit		
		Diffusion	Nesslers Reagens reduziertem Ninhydrin Phenol-Hypochloritreagens Hydrobromit-Phenosafranin Pyrazol-Reagens	40 (25-130)	alkalische Hydrolyse (enzym. Desaminierung)
B	Ionen-austauscher	NH ₄ ⁺ gegen Na ⁺ des Austauscher-harzes	Colorimetrie nach Farbreaktion mit Nesslers Reagens Phenol-Hypochlorit Reagens	30-40	(enzym. Desaminierung)
C	Direktbestimmung	keine Isolation, Eiweißfällung mit TCE oder TCM-Na	Colorimetrie nach Farbreaktion mit Phenol-Hypochloritreagens Enzymatisch	40-50 40	Amide in hoher Konzentration saure Hydrolyse (enzym. Desaminierung)

)^x = Wirkungs-

dauer der

Störfak-

toren

A: bis zur Beendigung der Diffusion

B: bis zur Beendigung des Waschvorgangs

C: bis zur Beendigung der gesamten Analyse

Auswahl der Methoden

Für die Anwendbarkeit einer Untersuchungsmethode können folgende acht Kriterien zur Beurteilung herangezogen werden (3):

- I. Spezifität
- II. Empfindlichkeit
- III. Richtigkeit, dh. Abweichung vom tatsächlichen Wert
- IV. Reproduzierbarkeit, dh. die Fehlerbreite der Methode
- V. Schwierigkeitsgrad
- VI. Zeitbedarf
- VII. Chemikalienunkosten
- VIII. Apparativer Aufwand

Die Direktbestimmungsmethode von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER scheint für den Routinebetrieb eine geeignete Methode zu sein, da die Nachteile V. bis VIII. bei ihr unbedeutend sind (28). Sie sollte nun zur genaueren Überprüfung der Kriterien I. bis IV. mit einer Methode verglichen werden, die in diesen Punkten gute Ergebnisse erzielt. Als Vergleich scheint nur eine Methode geeignet, die isoliertes Ammoniak bestimmt, da bei diesen Methoden die saure Hydrolyse bei der Eiweißfällung entfällt, also eine Mikrodiffusions- oder Ionenaustauschermethode. Bei der Ionenaustauschermethode entsteht während der Adsorption zusätzliches Ammoniak nur durch enzymatische Desaminierung, bei der Diffusionsmethode dagegen noch durch hydrolytische Spaltung der Aminosäuren. Hinsichtlich der Störfaktoren ist also die Ionenaustauschermethode genauer als die Diffusionsmethode. Das isolierte Ammoniak wird bei der Ionenaustauschermethode colorimetrisch bestimmt. Zur Farbreaktion werden Nessler's-Reagens (15) oder Phenol-Hypochloritreagens benutzt (9). Wie Tabelle 2 zeigt, ist die Empfindlichkeit der Phenol-Hypochloritmethode mit einem Extinktionskoeffizienten von 21.000 wesentlich höher als die mit Nessler'sreagens, deren Extinktionskoeffizient nur 3000 beträgt.

Eine geeignete Ionenaustauschermethode, bei der Phenol-Hypochlorit zur Farbreaktion benutzt wird, stellt die Methode von Hyland dar.

Bei ihr werden alle Reagenzien in standardisierter Abpackung geliefert. Das hat gegenüber allen anderen Methoden den bedeutenden Vorteil der Reagenzienkonstanz. Der Reagenzienansatz verursacht keine zusätzlichen Fehlerquellen. Die Ionenaustauschermethode mit den Hyland-Testreagenzien stellt im Vergleich mit anderen Methoden einen guten Maßstab für die klinische Anwendbarkeit dar: durch

1. Selektive Ammoniakbestimmung
2. Geringe Störfaktoren
3. Konstanz der Reagenzien
4. Hohe Empfindlichkeit
5. Geringen apparativen Aufwand.

Es soll nun in den Untersuchungen folgendes festgestellt werden:

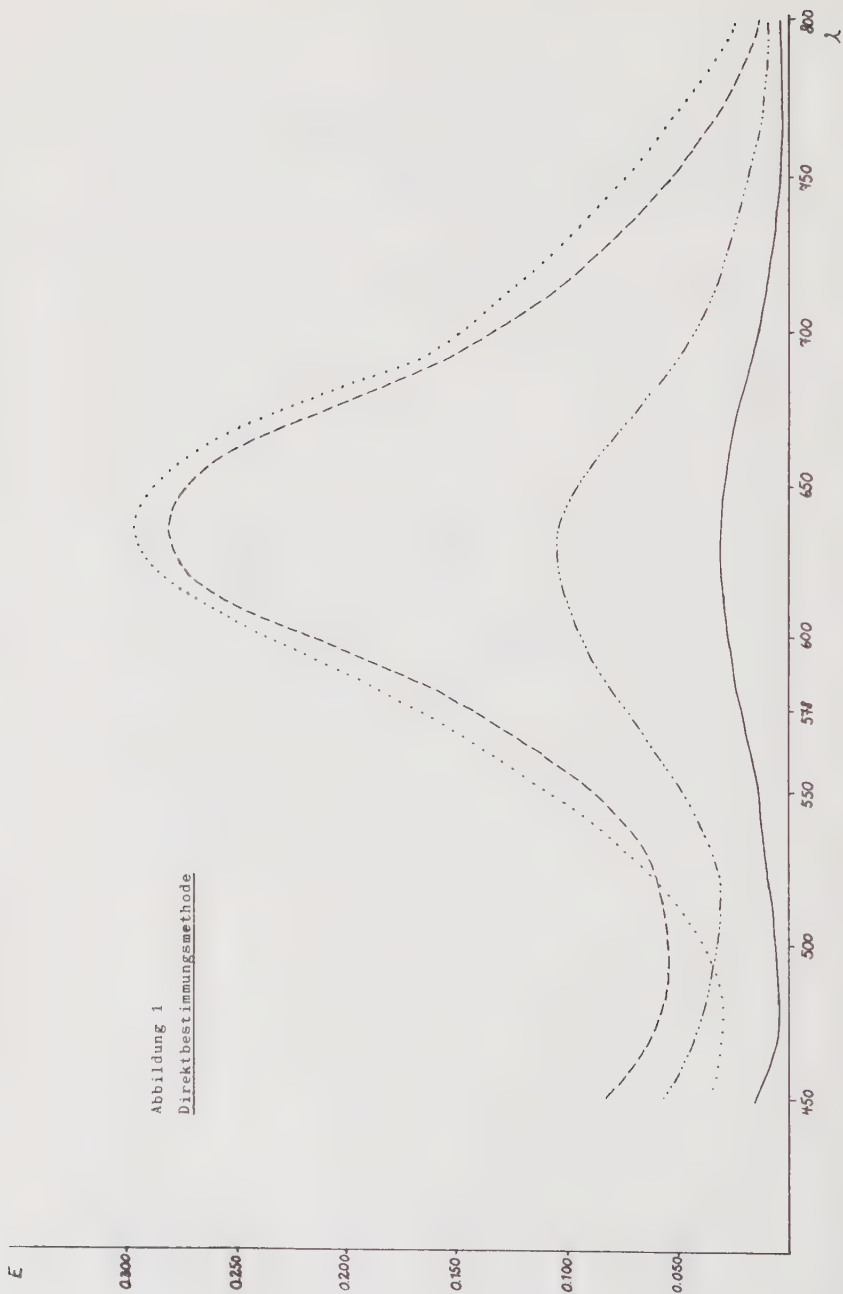
1. Sind die Ergebnisse der Direktbestimmungsmethode von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER in allen Meßbereichen identisch mit denen der Ionenaustauschermethode mit den Hyland-Testreagenzien?
2. Ist die Zeitersparnis der Direktbestimmungsmethode von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER so erheblich, daß eventuell geringe Abweichungen in Kauf genommen werden können?
3. Ist die Direktbestimmungsmethode von MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER durch den einfacheren Analysengang für den klinischen Routinebetrieb geeigneter?

Tabelle 2

Vergleich der Empfindlichkeit verschiedener
colorimetischer Bestimmungsmethoden

Methoden	Untersucher	Ext ^{x)}	bei μ
Nessler'sche Reaktion		3000	420
Ninhydrin-Methode	Ternberg et al.	15500	546
	Weller	16800	546
Phenol + Hypochlorit	Weller	20300	614
" "	Ternberg	21000	625
Phenol + Chloramin	Weller	2600	614

^{x)} = Molarer Extinktionskoeffizient



Ionenaustauschermethode mit den Hyland Testreagenzien

P r i n z i p :

Das Ammoniak, das im Plasma des frisch entnommenen Blutes enthalten ist, wird selektiv an ein Ionenaustauscherharz adsorbiert. Dabei wird das Ammoniak gegen Natriumionen des Harzes ausgetauscht. Anschließend wird das Plasma aus dem Harz gewaschen, mit Natriumionen das Ammoniak aus dem Harz wieder eluiert und seine Menge als Ammoniak-Stickstoff colorimetrisch mit der Hyland Phenol-Hypochlorit Methode unter Katalysatorwirkung von Natriumnitroprussid bestimmt.

Für die U n t e r s u c h u n g w e r d e n b e n ö t i g t :

1. Zentrifugengläser
2. Zentrifuge
3. Glasschliffröhrchen mit
eingeschliffenen Stöpseln
4. Pipetten
5. Wasserstrahlpumpe
6. Wasserbad 37°C
7. Photometer und 1cm Küvetten
8. Spritzen und Kanülen
9. Liquemin
10. Aqua bidestillata
11. Hyland Testreagenzien

Alle Glassachen werden zur Reinigung in eine RBS-Lösung* gelegt. Anschließend werden sie mit Leitungswasser gereinigt, um die Seife zu entfernen, und danach mit Kaliumdichromatlösung gespült. Kaliumdichromat wirkt oxydativ reinigend, entfernt den Fettfilm und ist somit das wirksamste Reinigungsmittel. Anschließend werden die Gläser und Pipetten je viermal mit Leitungswasser und Aqua destillata gespült. Alle Glassachen werden im Wärmeschränk getrocknet und anschließend in geschlossenen Schubladen oder Schränken aufbewahrt, um eine neuerliche Verschmutzung durch Luftammoniak zu vermeiden.

Die Wasserstrahlpumpe benötigen wir neben der Reinigung der Pipetten für die Entfernung des Plasmaüberstandes vom Harz nach der Ammoniakadsorption. Hierzu wurde eine 0,1ml Blutzucker-

* Hersteller: Firma Roth, Karlsruhe

pipette an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen und das Plasma abgesaugt. Bei diesem Waschvorgang konnte maximal ein Körnchen Harz verlorengehen, da die Pipette schon dadurch verschlossen wurde.

Die Extinktion wurde mit dem Photometer Eppendorf gemessen. Das Extinktionsmaximum des gebildeten blauen Farbstoffs vom Typ der Indophenole liegt bei der Wellenlänge 630nm (Abb.1). Bei Anwendung von streng monochromatischem Licht ist es nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz zur sicheren quantitativen Bestimmung nicht erforderlich, daß die Meßwellenlänge mit dem Extinktionsmaximum der färbenden Verbindung zusammenfällt. Messungen bei einer neben dem Extinktionsmaximum liegenden Wellenlänge bedingen lediglich eine geringere Extinktion pro Konzentrations-einheit. Die Eichkurve (Extinktion gegen Konzentration) ist jedenfalls auch bei einer vom Extinktionsmaximum beträchtlich entfernten Meßwellenlänge linear (Abb. 3, 4). Da der Extinktionsverlust bei allen drei Messungen: Leerwert, Standard und Probe prozentual gleich ist und die Berechnungen gegen den Meßwert der Standardextinktion erfolgt, führten wir unsere Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 578nm durch.

In der Durchführungsanleitung zum Hyland Blutammoniak-Test wird vorgeschlagen, während der Bestimmung die Reagenzgläser mit Parafilm "M" oder Saran Wrap (Dow) zu verschließen. Da uns bei dem mehrfachen Öffnen und Schließen der Gläser der Parafilm immer wieder riß, benutzten wir zur Bestimmung 20ml Glasschliff-röhrchen mit Schliffstopfen. Damit ersparten wir uns das Zuschneiden und die Kosten des Parafilms.

Die Spritzen, die wir zur Blutabnahme benutzten, wurden zuvor mit Liquemin durchgezogen. Da wir das Ammoniak des P l a s m a s quantitativ bestimmen wollten, vermieden wir damit die Blutgerinnung und eine Verfälschung der quantitativen Analyse.

Durchführung

Der Hyland Reagenzien-Satz enthält:

- A. Prep Resin, ein Kationenaustauscherharz, 5g
- B. 4n Natriumchloridlösung, 100ml
- C. Stickstoffstandard (70,7mg / 100ml Ammoniumsulfat), 2ml
- D. Test-Resin, ein Kationenaustauscherharz, 20 ml
- E. Phenol-Farbreagens (Phenol mit Nitroprussid-Natrium als Katalysator), 5g
- F. Alkali-Hypochloritreagens (Natriumhydroxyd und Natriumhypochlorit), 14ml

Prep Resin dient zur Herstellung von ammoniakfreiem destilliertem Wasser. Dazu werden 5g des Prep Resin (in Fläschchen abgepackt) zu 500ml Aqua bidestillata hinzugefügt und zwei Minuten gut geschüttelt. Nachdem sich das Harz abgesetzt hat, benutzt man das nun ammoniakfreie Wasser zur Herstellung der Reagenzien und bei der Durchführung der Ammoniakbestimmung.

Im standardisierten Stickstoffstandard liegt das Ammoniak in einer Konzentration von 15000µg/100ml vor. Zur Bestimmung wird ein 150µg/100ml Standard benötigt. Um diesen herzustellen werden zu 0,30ml 4n Natriumchloridlösung 0,10ml des Standards gegeben und dies auf 10,0ml aufgefüllt. Diese Lösung muß täglich frisch angesetzt werden, um eine Verunreinigung der Standardlösung zu vermeiden.

Das Test-Resin ist ein Kationenaustauscherharz, das die Ammoniakionen des Blutplasmas selektiv adsorbiert. Es ist mindestens ein Jahr stabil, wenn es bei +2° bis +10°C aufbewahrt wird.

Phenol-Farbreagens wird in kristallisierter Form geliefert. Zur Verflüssigung stellten wir die Flasche für einige Minuten in heißes Wasser. Zum Ammoniaknachweis muß die Lösung noch verdünnt werden: 5g (abgepackt) ad 100ml Wasser. Die fertige Lösung wird in einem dunklen Glas- oder Plastikgefäß aufbewahrt, um die Oxydation durch den katalytischen Einfluß des Lichtes und damit eine Struktur- und Farbänderung des Phenols und Natriumnitro-

prussids zu vermeiden. Bei einer Temperatur von $+2^{\circ}$ bis $+10^{\circ}\text{C}$ ist die Lösung dann mindestens sechs Monate stabil.

Das Alkali-Hypochloritreagens muß ebenfalls mit Wasser auf 100ml aufgefüllt werden. Die Kappe des Kunststofffläschchens wird mit einem über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Glasstab durchstoßen. Durch mehrfaches Ausdrücken wird der Inhalt entleert und auf 100ml mit Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird im Plastikbehälter im Kühlschrank bei einer Temperatur von $+2^{\circ}$ bis $+10^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. (Stabilität mindestens sechs Monate).

D u r c h f ü h r u n g d e r B l u t a m m o n i a k b e - s t i m m u n g:

Für den Test wird nur ammoniakfreies destilliertes Wasser verwendet.

1. Vorbereitung im Labor:

Man pipettiert in vier beschriftete Glasschliffröhrchen je 2 Milliliter Wasser und verschließt die Röhrchen mit den Schliffstopfen.

2. Blutentnahme und Vorbereitung:

Bei geringer Stauung entnimmt man 8 bis 10 ml venöses Blut mit 10 ml Spritzen, die zuvor mit Liquemin durchgespült wurden. Das Blut wird sofort mit senkrecht gehaltener Spritze in ein Zentrifugenröhrchen gespritzt und dies gut mit einem Glasschliffstopfen verschlossen.

Die Zentrifugenröhrchen werden in einem Eiswasser-Gemisch so schnell wie möglich ins Labor gebracht und bei einer Umdrehung von 2000/Min. fünf Minuten zentrifugiert.

In je eins der vorbereiteten beschrifteten Reagenzgläser wird dann pipettiert:

In a: 1 ml Wasser (Leerwert)

In b: 1 ml Ammonsulfat Standard $150\mu\text{g}/100\text{ml}$ (Standardwert)

In c u. d: je 1 ml Blutplasma (Doppelbestimmung der Probe)

3. Ammoniakadsorption:

Eine Pipette mit weiter Öffnung (am besten mit abgebrochener Spitze) füllt man mit Test-Resin und wartet 15 Sekunden,

bevor 0,2 ml (etwa 5 Tropfen) des sich absetzenden Harzes in jedes Röhrchen gegeben werden. Nun erfolgt der Austausch der NH_4^+ -Ionen gegen die Na^+ Ionen. Man verschließt die Röhrchen mit Glasschliffstopfen und schüttelt sie 5 Minuten.

4. Waschvorgang:

Zu jedem Röhrchen werden 10 bis 12 ml Wasser gegeben, die Röhrchen verschlossen und durch mehrfaches Umkippen gemischt. Dann läßt man das Harz sich absetzen. Das an den Wänden haftende Harz spült man mit dem Überstand herunter. Den Überstand entfernt man durch sorgfältiges Absaugen mit einer 0,1 ml Blutzuckerpipette, die an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen wird. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt.

5. Elution:

Zu dem trockenen Harz, an das die Ammoniakionen adsorbiert sind, werden 1,0 ml 4n Natriumchloridlösung und 1,0 ml des verdünnten Phenolfarbreakagenzes gegeben. Durch Umschütteln mischt man sorgfältig, spült das Harz mit dem Überstand von den Reagenzglaswänden und läßt die Röhrchen drei Minuten bei Zimmertemperatur stehen. In dieser Zeit werden die Ammoniakionen wieder gegen die Natriumionen ausgetauscht.

6. Farbentwicklung:

In jedes Röhrchen pipettiert man 1,0 ml der angesetzten Alkali-Hypochloritlösung, mischt, spült das Harz von den Wänden und gibt es zur Farbentwicklung in ein Wasserbad von 37°C . Nach 15 Minuten nimmt man die Röhrchen mit dem nun blau gefärbten Inhalt aus dem Wasserbad und kühlt sie kurz unter fließend kaltem Wasser ab. Um den Farbstoff zu verdünnen, fügt man zu jedem Röhrchen 3 ml Wasser, mischt, läßt das Harz absetzen und gießt den Überstand in eine 1 cm Küvette.

7. Extinktionsmessung:

Die Extinktion wird im Photometer Eppendorf bei einer Wellenlänge von 578nm bei einer Schichtdicke von 1 cm gegen den Leerwert gemessen. Dadurch eliminiert man alle interferierenden Faktoren: Luftammoniak, Ammoniak der Glassachen, geringfügige Veränderungen der Reagenzien. Der Leerwert soll bei der Ablesung gegen Wasser höchstens eine Extinktion von 0,090 haben. Wenn der Leerwert eine höhere Extinktion zeigt, so sind die Glassachen,

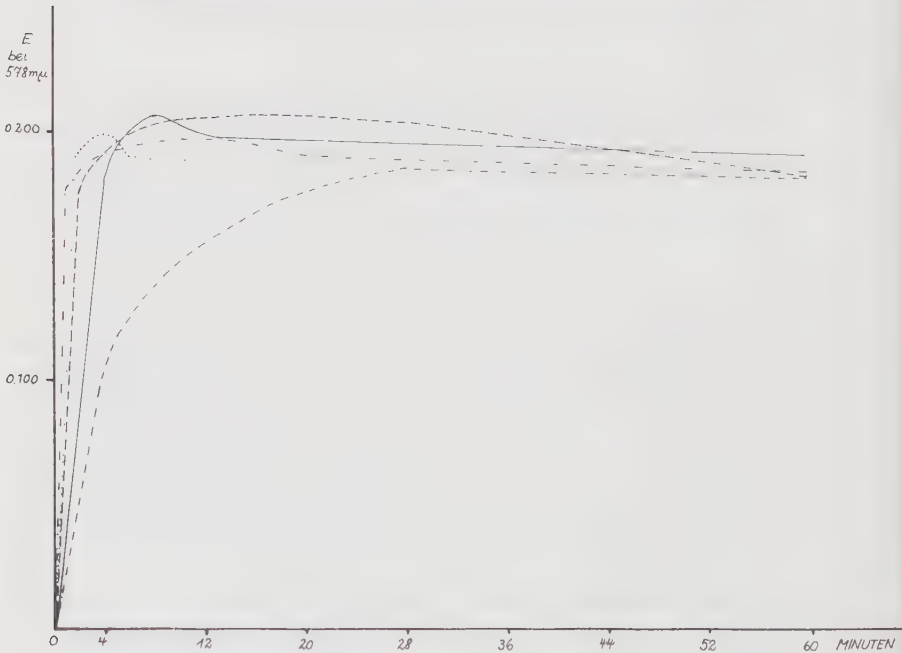
das benutzte Wasser oder die Reagenzien mit Ammoniak verunreinigt, oder die Reagenzien sind zu alt geworden.

8. Berechnung:

Die Adsorption ist direkt proportional der Ammoniak-Stickstoff-Konzentration:

$$\frac{\text{Extinktion (Probe)}}{\text{Extinktion (Standard)}} \times \mu\text{g}/100\text{ml Standard} = \mu\text{g}/100\text{ml Probe}$$

Abhängigkeit der Farbentwicklung von Zeit und Temperatur
(Abb. 2)



150 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ Standard gemessen gegen H_2O

Wasserbad 37°C keine Abkühlung

Wasserbad 37°C nach 14 Min. Abkühlung

Wasserbad 37°C nach 7 Min. Abkühlung

Zimmertemperatur keine Abkühlung

Eisbad

.....
.....

.....

Man erreicht die endgültige Farbintensität des Indophenol-Farbstoffs bei genügend langer Wartezeit bei Zimmertemperatur und sogar im Eis-Wasser-Bad. Schneller erreicht man sie, wenn man die Reagenzgläser erst für kurze Zeit in ein Wasserbad von 37°C stellt. Das Maximum der Farbintensität ist dabei nach 10 Minuten erreicht. Die Intensität nimmt anschließend bei Zimmertemperatur innerhalb von 3 Minuten ungefähr um 5 % ab und bleibt konstant auf diesem Niveau bis zu 24 Stunden. Erwärmt man länger als 15 Minuten im Wasserbad, so fällt die Intensität der Farbverbindung langsamer ab und erreicht ihr konstantes Niveau erst nach 60 Minuten.

Bei dieser Versuchsreihe wurde gleich nach Zugabe des Phenol-Hypochloritreagenzes mit 3 ml Wasser verdünnt, um vergleichbare Werte zu erhalten. Die Extinktion der Standardwerte wurde gegen Wasser gemessen.

S t a n d a r d e i c h k u r v e n :

Da die Berechnung der Plasmawerte gegen einen Standardwert durchgeführt wurde, stellten wir zur Überprüfung des Standardwertes und der Testreagenzien bei jedem Neuansatz der Reagenzien eine Standardeichkurve her. Dazu wurden aus dem $15000\mu\text{g}/100\text{ml}$ Stickstoff-Standard Verdünnungen mit 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 und $600\mu\text{g}/100\text{ml}$ hergestellt. Die Standard-Lösungen wurden wie zuvor beschrieben verarbeitet.

Die Standardeichkurven ergaben jedesmal eine Gerade. Bei Messungen mit neuen Testreagenzien lagen die Standardeichkurven sehr dicht beieinander (Tab. 3 und Abb. 3). Bei Messungen mit älteren Testreagenzien wurden die Standardabweichungen jedoch größer. (Abb. 4)

Abbildung 3

Standardkurven mit neuen Testreagenzien

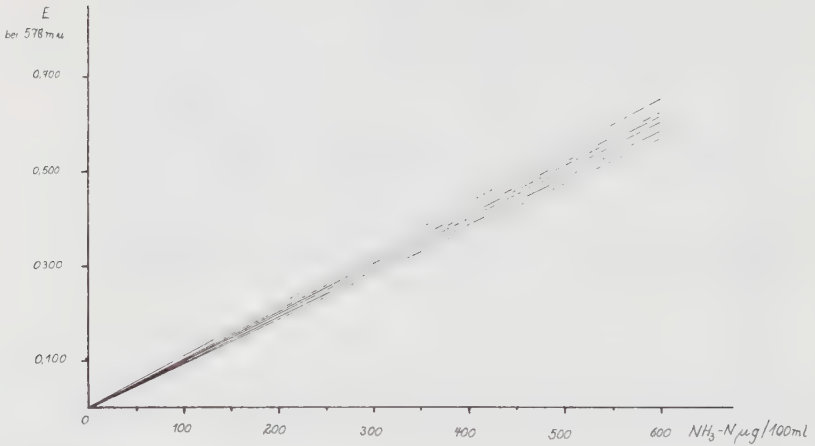
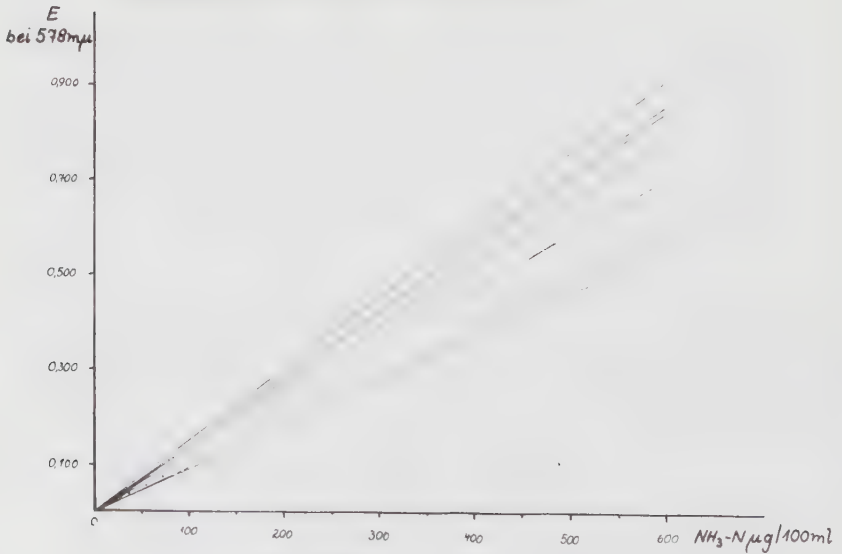


Abbildung 4

Standardkurven mit älteren Testreagenzien



..... gibt den Mittelwert der Standarddeichkurven mit
neuen Testreagenzien an

Tabelle 3

Standardwerte bei neuen Testreagenzien

$\mu\text{g}/100\text{ml}$ $\text{NH}_3\text{-N}$	50	100	150	200	300	400	500	600
	0,060	0,110	0,163	0,208	0,325	0,439	0,535	0,650
Extinktion	0,057	0,100	0,155	0,210	0,316	0,412	0,512	0,623
bei	0,050	0,102	0,152	0,200	0,314	0,412	0,500	0,622
578 nm	0,052	0,099	0,150	0,199	0,297	0,402	0,497	0,603
	0,049	0,097	0,144	0,190	0,287	0,375	0,482	0,580
	0,047	0,096	0,142	0,186	0,280	0,371	0,471	0,565
M =	0,052	0,102	0,151	0,199	0,303	0,402	0,499	0,607
$\pm s$ =	0,0046	0,0047	0,0070	0,0084	0,0150	0,0230	0,0200	0,028

M = Mittelwert

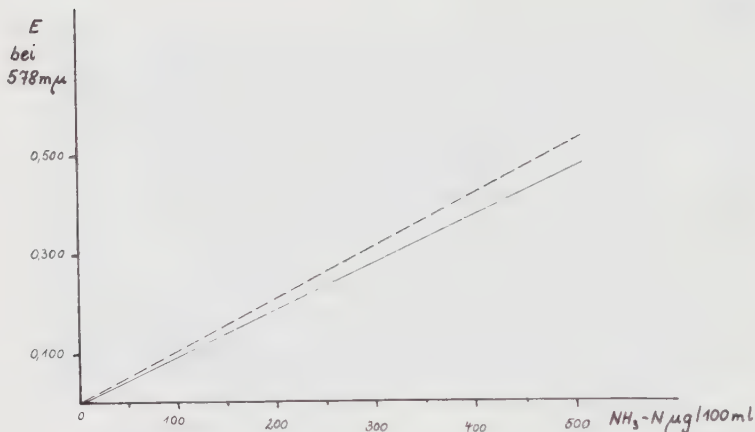
s = Standardabweichung

Der Mittelwert des $150\mu\text{g}/100\text{ml}$ Standards, der zur Berechnung des Plasmaammoniakgehaltes verwendet wurde, lag bei einer Extinktion von 0,154. Die Standardabweichung betrug $\pm 0,0035$. Die Leerwerte, deren Extinktionen gegen Wasser gemessen wurden, lagen zwischen 0,031 und 0,075. Der Mittelwert hatte die Extinktion 0,051.

Ein Vergleich von Standardlösungen, die an Harz adsorbiert wurden, und Standardlösungen, zu denen ohne vorherige Adsorption Phenol- und Hypochloritreagens hinzugegeben wurde, zeigte einen ungefähr 10%-igen Verlust von $\text{NH}_3\text{-N}$ (Abb. 5). Dieses Ammoniak geht bei der Adsorption an das Harz, dem Waschvorgang und der anschließenden Elution verloren. Dieser Verlust ist bei Standard und Plasma prozentual gleich, so daß die Bestimmung des Plasmaammoniaks gut reproduzierbare Werte zeigt, da diese nach dem Standardwert berechnet wird.

Abbildung 5

Standardkurve mit und ohne Harz



Normalwerte:

Der Normalbereich der Ionenaustauschermethode wurde an venösen Blutproben von 69 gesunden Versuchspersonen (Krankenschwestern und Studenten) bestimmt. Die Laboruntersuchung des Blutes wurde sofort nach der Blutabnahme begonnen. Wir erhielten Werte von 30,2 bis 97,4 μg/100ml Ammoniak (Abb. 11) mit einem Mittelwert von 54,4 μg/100ml und einer Standardabweichung von $\pm 15,4$.

Die Standardabweichung des Blutammoniakgehaltes einer gesunden Versuchsperson (Tab. 4), der siebenmal hintereinander bei liegender Kanüle venöses Blut entnommen wurde, betrug bei Doppelbestimmungen nur $\pm 2,9$.

Tabelle 4

7malige Doppelbestimmung bei einer Versuchsperson

E	E	$\text{NH}_3\text{-N}_{\mu\text{g}}/100\text{ml}$	
0,051	0,049	50,0	
0,047	0,050	48,5	
0,052	0,052	52,0	M = 49,9
0,043	0,048	45,0	s = $\pm 2,9$
0,046	0,051	48,5	
0,053	0,057	55,0	
0,047	0,054	50,5	

E = Extinktion

M = Mittelwert

s = Standardabweichung

Die Extinktionsdifferenzen aller durchgeführten Doppelbestimmungen reichten von 0,000 bis 0,021 mit einem Mittelwert von 0,005. Diese Extinktion entspricht bei Berechnung mit dem Mittelwert des $150\mu\text{g}/100\text{ml}$ Standards einem Ammoniakgehalt von $4,85\mu\text{g}/100\text{ml}$.

Wiederfindung

Mit Wiederfindungsversuchen wird geprüft, in wie weit die gemessenen Ergebnisse mit den errechneten übereinstimmen. Der errechnete Wert ist die Addition aus Standard- und Plasmawert in $\mu\text{g}/100\text{ml}$ (Spalte A + B in Tab. 5). Den Meßwert (Spalte C in Tab. 5) erhält man durch folgenden Versuch (Doppelbestimmung): In zwei Reagenzgläsern werden je 1ml Plasma, 1ml Standard und 1ml ammoniakfreies Wasser gegeben. Anschließend werden diese Proben wie üblich weiter verarbeitet. Das Plasma des errechneten Wertes und des Meßwertes stammt von der gleichen Blutprobe. Beide Werte werden gleichzeitig bestimmt.

Die Wiederfindungsquote gibt an, wieviel Prozent des errechneten Wertes das gemessene Ergebnis beträgt, wenn der errechnete Wert mit 100% festgelegt wird.

Der Mittelwert der Wiederfindungsquote lag bei 86,9 %

Tabelle 5

Wiederfindung

Person	A	B	A+B	C	C-(A+B)	D
1.	81,6	150	231,6	199,0	-32,6	85,6
2.	70,6	150	220,6	180,5	-40,1	82,0
3.	66,0	150	216,0	186,6	-30,0	86,1
4.	56,3	150	206,3	146,0	-60,3	71,2
5.	303,0	150	453,0	413,0	-40,0	91,2
6.	344,0	150	494,0	465,0	-29,0	94,2
7.	70,0	150	220,0	216,5	- 3,5	98,1

A.: In der Blutprobe bestimmter Ammoniak in $\mu\text{g}/100\text{ml}$

B.: Hinzugefügter Ammoniak in $\mu\text{g}/100\text{ml}$

C.: Gefundener Ammoniak in $\mu\text{g}/100\text{ml}$

A+B: Erwarteter Ammoniak in $\mu\text{g}/100\text{ml}$

C-(A+B): Differenz in $\mu\text{g}/100\text{ml}$

D.: Wiederfindungsquote in %

Direktbestimmungsmethode

P r i n z i p:

Das Ammoniak des Plasmas wird nach Eiweißfällung mit Trichlor-essigsäure direkt colorimetrisch bestimmt. Zum Plasma werden Phenolreagens mit Natriumnitroprussid als Katalysator und Hypochloritreagens hinzugegeben. Es bildet sich ein blauer Farbstoff vom Typ der Indophenole, dessen Extinktion direkt proportional der Ammoniakkonzentration des Plasmas ist.

F ü r d i e U n t e r s u c h u n g w e r d e n b e n ö t i g t:

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------|
| 1. Spritzen und Kanülen | 7. Photometer und 4cm Küvetten |
| 2. Zentrifugenröhrchen mit Stopfen | 8. Phenolreagens |
| 3. Reagenzgläser | 9. Hypochloritreagens |
| 4. Pipetten | 10. TCE |
| 5. Zentrifuge | 11. Aqua bidestillata |
| 6. Wasserbad | 12. Ammonsulfatstandard |

Die Glassachen werden wie bei der Ionenaustauschermethode gereinigt.

Durchführung

R e a g e n z i e n:

A. Phenolreagens:

10,0g Phenol (p.a. Merck 206) und 50mg Natriumnitroprussid (p.a. Merck 6541) werden in warmem Aqua bidestillata gelöst und auf ein Endvolumen von 1 Liter gebracht.

B. Hypochloritreagens:

90g Dinatriumhydrogenphosphat = $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (p.a. Merck 6579), 10,0g Natriumhydroxyd = NaOH in rotulis (p.a. Merck 6496) und 10ml ca. 5%-iger Hypochloritlösung werden auf 1 Liter Aqua bidestillata gelöst. Das p H dieser Lösung ist ca. 12,9.

Ansatz der Hypochloritlösung: 3,85ml Hypochlorit mit 13 % aktivem Chlor (Merck 5614) werden auf 10ml mit Aqua bidestillata aufgefüllt.

Die Lösungen A und B sind mehrere Wochen im Kühlschrank haltbar. Zeigt sich allerdings eine Verfärbung der normalerweise wasserhellen Lösungen, so ist ein neuer Ansatz notwendig.

C. Trichloressigsäure:

10,0g TCE (p.a. Merck 807) werden auf 100ml Aqua bidestillata gelöst.

D. Ammoniumsulfatstandard:

0,472g Ammoniumsulfat = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (p.a. Merck 1217) werden auf 1 Liter Wasser gelöst. Diese Lösung enthält 10 000µg/100ml $\text{NH}_3\text{-N}$. Durch geeignete Verdünnung wird eine Standardreihe zwischen 500µg/100ml und 5000µg/100ml hergestellt.

Durchführung der Blutammoniakbestimmung:

1. Vorbereitung im Labor:

Zur Bestimmung des Reagenzienleerwertes und des Standardwertes mischten wir 2ml Wasser beziehungsweise 2ml Standard im Verhältnis 1:1 mit TCE und pipettierten davon 0,5ml in je ein Reagenzglas und verschlossen dieses mit Glasschliffstopfen.

2. Blutentnahme und Vorbereitung:

Je 2ml TCE pipettierten wir in zwei Zentrifugengläser, versehen diese mit Glasschliffstopfen und setzten sie in ein Gefäß mit einer Eis-Wassermischung. Die so vorbereiteten Zentrifugengläser wurden zum Patienten gebracht. Mit einer 5ml Spritze entnahmen wir dem Patienten bei geringer Stauung ca. 5ml venöses Blut. Wir achteten darauf, daß sich keine Luftblasen in der Spritze bildeten und keine Hämolyse eintrat. Unmittelbar anschließend spritzten wir mit senkrecht nach unten gehaltener Spritze genau 2ml Blut in jedes Zentrifugenglas. Die Gläser wurden mit Glasstopfen versehen, zur Mischung gut geschüttelt und im Eisbad so schnell wie möglich

zur Bestimmung ins Labor gebracht. Das TCE-Präzipitat wurde sofort bei einer Umdrehung von 2000/Min. fünf Minuten abentrifugiert.

3. Farbentwicklung:

Vom klaren Überstand pipettierten wir zur Doppelbestimmung jeweils 0,5ml in zwei beschriftete Reagenzgläser. Zum Plasma, Leerwert und Standard fügten wir je 6ml Phenolfarbreagens und mischten durch Schütteln. Je 6ml Hypochloritreagens wurden hinzugefügt und der Inhalt abermals gemischt. Die Ansätze stellten wir zur Farbentwicklung für 30 Minuten in ein Wasserbad von 37°C.

4. Extinktionsmessung:

Die Extinktion maßen wir im Photometer Eppendorf bei einer Wellenlänge von 578nm bei einer Schichtdicke von 4cm gegen den Reagenzienleerwert. Dadurch eliminierten wir alle bei der Bestimmung interferierenden Faktoren: Luftammoniak, Ammoniak der Geräte und des Wassers und geringfügige Veränderungen der Reagenzien.

5. Berechnung:

Die Extinktion des gebildeten Farbstoffs ist direkt proportional der Ammoniakstickstoffkonzentration des Plasmas.

$$\frac{\text{E Blutprobe}}{\text{E Standard}} \times \mu\text{g}/100\text{ml Standard} = \mu\text{g}/100\text{ml Blutprobe}$$

E = Extinktion gegen Leerwert gemessen. Die Extinktion des Leerwertes, die gegen Wasser gemessen wird, soll 0,090 nicht überschreiten.

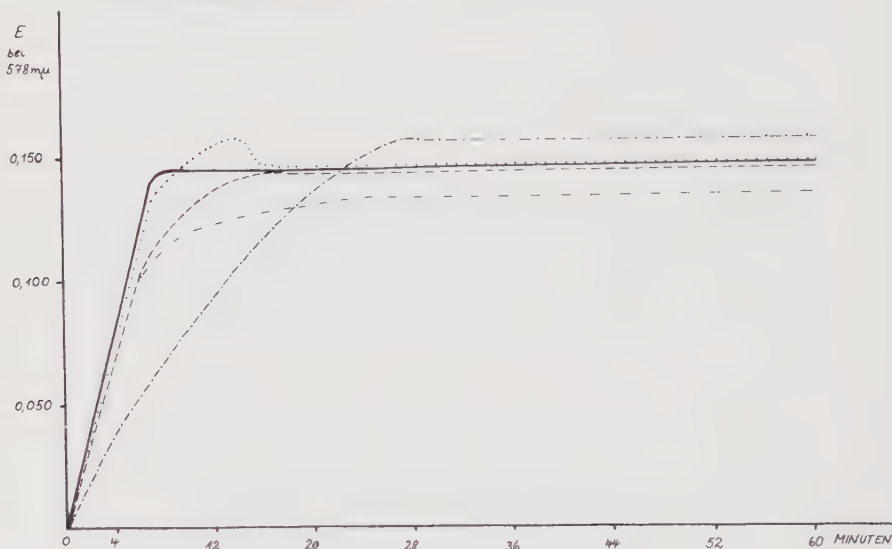
Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Farbentwicklung: (Abb. 6)

Im Wasserbad bei 37°C findet zunächst ein steiler Anstieg der Farbentwicklung statt. Läßt man diese Temperatur 7 Minuten einwirken, so geht die Reaktion anschließend bei Zimmertemperatur von 21°C langsamer und erreicht nach 30 Minuten ihr Maximum. Die erhaltene Farbe ist sehr konstant, noch nach 24 Stunden zeigt sie die gleichen Extinktionswerte. Nach 14 minütiger Einwirkungsdauer der Temperatur von 37°C hat die Farbintensität ein

Maximum, das dann aber innerhalb von zwei Minuten auf ein konstantes Niveau absinkt.

Abbildung 6

Zeit-Temperaturkurve



100 % Standard gemessen gegen Wasser

Wasserbad 37°C	keine Abkühlung	-----
Wasserbad 37°C	nach 14 Min. Abkühlung	
Wasserbad 37°C	nach 7 Min. Abkühlung	-----
Wasserbad 37°C	nach 30 Min. Abkühlung	-----
Zimmertemperatur	keine Abkühlung	-. - . - . - . - . -

Wir wählten für unsere Messungen nach Angabe von MÜLLER-BEISSEN-HIRTZ und KELLER die Einwirkzeit von 30 Minuten, da bei dieser Zeit die Farbintensität ihren Maximalwert, der zugleich ihr konstantes Niveau ist, erreicht hat. Bei längerer Wartezeit erreicht man die endgültige Extinktion auch bei Zimmertemperatur, nicht dagegen im Eis-Wasserbad.

S t a n d a r d e i c h k u r v e n :

Die Berechnung der Plasmawerte erfolgte gegen einen Standardwert. Zur Überprüfung des Standardwertes und der Testreagenzien stellten wir bei jedem Neuansatz der Reagenzien eine Standard-eichkurve her. Dazu wurden aus dem 10 000µg/100ml Standard Verdünnungen von 50, 100, 200, 300, 400 und 500µg/100ml hergestellt und davon je 2ml im Verhältnis 1:1 mit TCE gemischt. Je 0,5ml dieses Gemisches wurden in gleicher Weise wie das Plasma bestimmt. Ergaben die Standardwerte bei wiederholtem Ansetzen keine Gerade, so war das Phenol- und Hypochloritreagens nicht mehr rein und somit unbrauchbar.

Abbildung 7

Standardkurven

Messung gegen den Reagenzienleerwert

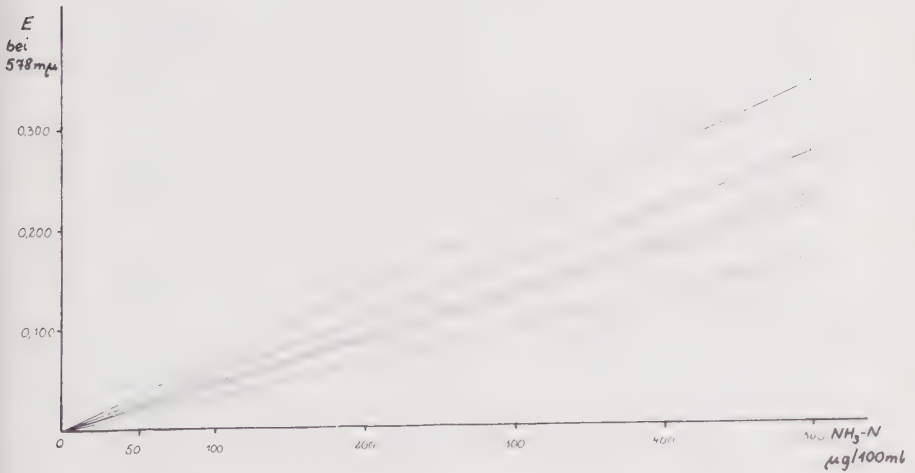
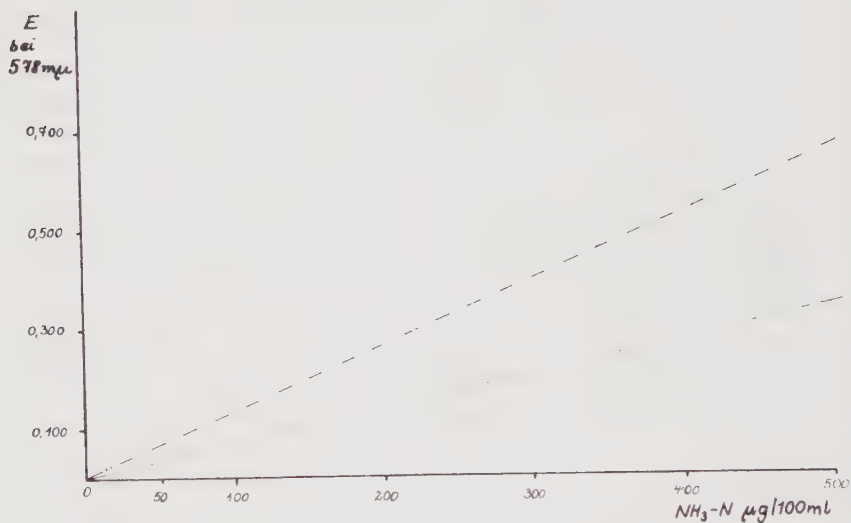


Abbildung 8

Standardkurve mit und ohne TCE



Jede Standardkurve, bei der der Standard im Verhältnis 1:1 mit TCE gemischt war, ergab eine Gerade (Abb. 7), die bei Messung gegen den Reagenzienleerwert durch den Nullpunkt verlief.

Die Standardkurve ohne TCE lag ungefähr 50 % höher als die der Verdünnung. Dies entspricht genau dem Mischungsverhältnis 1:1 (Abb. 8, Tab. 6).

Tabelle 6

Standardvergleich mit und ohne TCE

Standardkonzentration NH ₃ -N µg/100ml		Nr.	50	100	200	300	400	500
E ohne	1.	0,060	0,125	0,258	0,397	0,531	0,661	
bei TCE								
578mm mit	2.	0,032	0,065	0,130	0,203	0,272	0,343	
prozentuale Abweichung			53,3	52,0	50,4	51,1	51,1	51,8

Der Mittelwert der 100µg/100ml Standardlösungen, die wir zur Berechnung des Plasmaammoniakgehaltes benutzten, lag bei einer Extinktion von 0,050. Die Standardabweichung der Extinktionswerte betrug $\pm 0,012$. Das Extinktionsmittel der Leerwerte, die gegen Wasser gemessen wurden, lag bei 0,040. Dieser Wert gibt das "Schmutzammoniak" an. Obwohl wir auf größte Reinheit der Reagenzien und der Glassachen achteten, konnten wir für den Leerwert kaum kleinere Extinktionswerte erreichen. Ein bedeutender Teil des "Schmutzammoniaks" ist das Ammoniak der Luft. Dieses steigt an in Labors, in denen zB. geraucht und Urin untersucht wird. (Ammoniakgehalt des Tabakrauchs und des Urins)

N o r m a l w e r t e :

Um den Normalbereich der Direktbestimmungsmethode festzustellen, maßen wir bei 60 gesunden, nüchternen Versuchspersonen (Studenten und Krankenschwestern) den venösen Blutammoniakspiegel. Die Werte lagen zwischen den Extremwerten 14,6 und 99,4µg/100ml, mit einem Mittelwert von 78,7µg/100ml und einer Standardabweichung von $\pm 18,0$ (Abb. 11).

Wiederholte Doppelbestimmungen bei e i n e r Versuchsperson gaben genauere Auskunft über die Standardabweichung. Bei diesen Versuchen wurden einer Versuchsperson bei liegender Kanüle unmittelbar nacheinander siebenmal je 2ml Blut entnommen. Von diesen

2ml wurden jeweils sofort Doppelbestimmungen durchgeführt. Der Mittelwert dieser Bestimmungen lag bei $63,8\mu\text{g}/100\text{ml}$ mit einer Standardabweichung von nur $\pm 4,46$ (Tab. 7).

Tabelle 7

7malige Doppelbestimmung bei einer Person

E	E	$\text{NH}_3\text{-N}\mu\text{g}/100\text{ml}$
0,035	0,036	59,4
0,035	0,039	60,5
0,042	0,048	73,8
0,037	0,038	61,5
0,037	0,039	62,3
0,039	0,040	64,7
0,040	0,039	64,7

W i e d e r f i n d u n g:

Wiederfindungsversuche wurden so durchgeführt, daß zu 0,5ml Plasma noch 0,5ml Standard hinzugefügt wurden. Die gefundenen Werte sind in Tabelle 8 angegeben. Der Mittelwert der Wiederfindungsquote betrug 107 %, obwohl die gemessenen Einzelwerte bis zu 25 % von den errechneten Werten abwichen.

Tabelle 8

Wiederfindung

Person	A	B	A+B	C	C-(A+B)	D
1.	43,4	100	143,4	180,0	+36,6	125,0
2.	52,6	100	152,6	185,5	+32,9	122,0
3.	42,6	100	142,6	173,0	+30,4	121,0
4.	76,0	100	176,0	175,0	- 1,0	99,5
5.	63,2	100	163,2	126,5	-36,7	77,5
6.	57,7	100	157,7	142,0	-15,7	90,0

A.: in der Blutprobe bestimmtes Ammoniak in $\mu\text{g}/100\text{ml}$
 B.: hinzugefügtes Ammoniak in $\mu\text{g}/100\text{ml}$
 C.: gefundenes Ammoniak in $\mu\text{g}/100\text{ml}$
 A+B: erwartetes Ammoniak in $\mu\text{g}/100\text{ml}$
 C-(A+B): Differenz in $\mu\text{g}/100\text{ml}$
 D.: Wiederfindungsquote in %

Diskussion der Untersuchungsergebnisse

S p e z i f i t ä t:

Die Spezifität der Ionenaustauschermethode wird lediglich durch enzymatische Hydrolyse eingeschränkt. Diese kann bei sofortiger Analyse weitgehend vermieden werden. Die Abbildung 9 zeigt, daß der Anstieg des Ammoniaks erst 100 Minuten nach der Blutabnahme steiler wird. Zu diesem Ergebnis kamen wir durch folgenden Versuch: Wir nahmen Blut ab und zentrifugierten es. Bei einem Teil des Plasmas führten wir eine Sofortbestimmung durch, den Rest stellten wir in den Kühlschrank bei +4°C und fügten 77 und 137 Minuten nach Blutentnahme die Färbereagenzien hinzu. Während wir bei Messung 100 Minuten nach der Blutentnahme einen kaum merklichen Anstieg des Blutammoniaks beobachteten (3%), stieg der Ammoniakgehalt nach 160 Minuten um 50%.

Bei unseren routinemäßigen Untersuchungen addierten sich zu der Zeit der Blutabnahme folgende Zeiten:

1. Zentrifugieren	5 Min.
2. Abpipettieren des Plasma	3 Min.
3. Zufügen des Harzes, Adsorption und Waschvorgang	15 Min.
4. Elution und Zufügen der Testreagenzien	5 Min.
5. Farbentwicklung im Wasserbad	15 Min.
6. Verdünnung des Farbstoffs	3 Min.
7. Extinktionsmessung	3 Min.
Gesamtdauer	49 Min.

Auch wenn wir das Blut am Patientenbett abnehmen, besonders auf Stationen, die weit von unserem Labor entfernt lagen, und es nicht sofort bestimmen konnten, erreichten wir die Zeit der 100 Minuten und damit den steilen Anstieg des Plasmaammoniaks durch enzymatische Hydrolyse nicht.

Bei der Direktbestimmungsmethode wird durch saure und enzy-

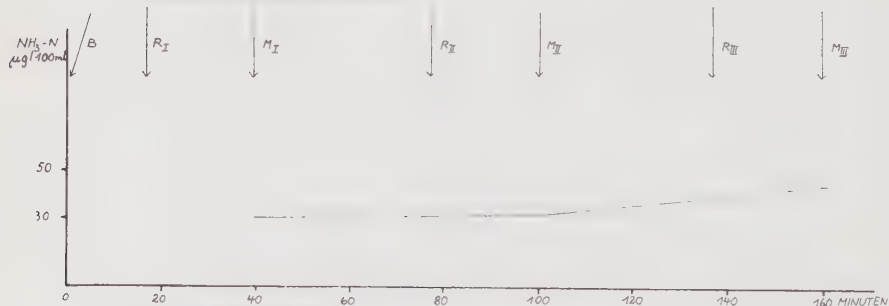
tische Hydrolyse aus Aminosäuren "artifizielles" Ammoniak freigesetzt. Die Abbildung 10 zeigt die Bildung dieses Ammoniaks in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden von derselben Versuchsperson dreimal unmittelbar nacheinander je 2ml venöses Blut entnommen und mit TCE gefällt. Alle drei Blutproben zentrifugierten wir sofort. Nach dem Zentrifugieren führten wir bei einer Probe sofort die Bestimmung durch, die zwei anderen bewahrten wir bis zur Bestimmung, die jeweils nach einer Stunde durchgeführt wurde, im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ auf. Die zweite Probe, bei der die Ablesung 100 Minuten nach Blutentnahme und 60 Minuten nach Ablesung der ersten Probe erfolgte, zeigte einen Anstieg von rund 20 %, während der Anstieg bei Ablesung 120 Minuten nach der Erstbestimmung ungefähr 100 % betrug. Bei unseren Bestimmungen addierten sich zur Blutabnahme folgende Zeiten:

1. Zentrifugieren	5 Min.
2. Abpipettieren des TCE-Extraktes	3 Min.
3. Hinzufügen der Farbreagenzien	5 Min.
4. Farbentwicklungen im Wasserbad	30 Min.
5. Extinktionsmessung	<u>3 Min.</u>
Gesamtzeit	46 Min.

Ammoniakanstieg bei längerer Analysendauer

Abbildung 9

Ionenaustauschermethode



B = Blutentnahme

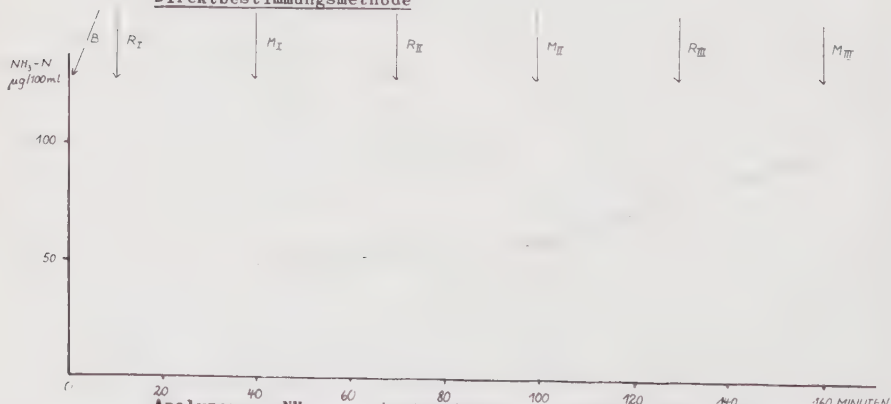
R = Reagenzienzugabe

M = Extinktionsmessung

Analysen- zeit	NH ₃ -N µg/100ml	Anstieg%	NH ₃ -N µg/100ml	Anstieg%	NH ₃ -N µg/100ml	Anstieg%
40 Min.	30,8		48		42	
100 Min.	31,8	6	50	4	42	0
160 Min.	45,0	50	70	46	60,2	43,4

Abbildung 10

Direktbestimmungsmethode

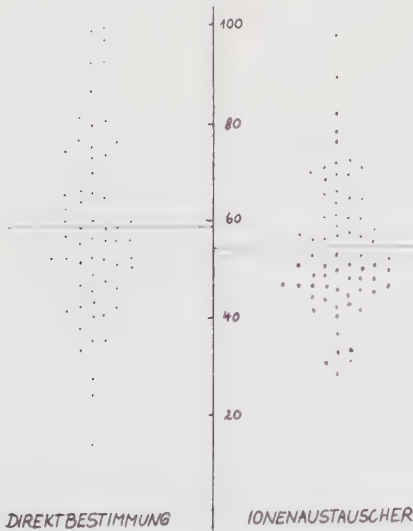


Analysen- Zeit	NH ₃ -N µg/100ml	Anstieg%	NH ₃ -N µg/100ml	Anstieg%	NH ₃ -N µg/100ml	Anstieg%
40 Min.	48		37		56	
100 Min.	58	20,8	45	18,8	68	21,4
160 Min.	98	104,0	75	102,5	107	91,0

Der Zeitaufwand der Direktbestimmungsmethode ist also gleich dem der Ionenaustauschermethode. Durch die Fällung des Eiweißes mit der sehr starken Säure (TCE) entsteht während der Bestimmungszeit Ammoniak nicht nur durch enzymatische, sondern auch durch saure Hydrolyse. Diese verursacht den im Vergleich zur Ionenaustauschermethode höheren Ammoniakanstieg innerhalb einer Bestimmungszeit von 100 Minuten. Dasselbe zeigt auch ein Vergleich der Mittelwerte des Blutammoniaks bei gesunden Versuchspersonen. Das Mittel von 60 Bestimmungen lag bei der Direktbestimmungsmethode bei $58,7\mu\text{g}/100\text{ml}$, also 8% höher als bei der Ionenaustauschermethode, deren Mittelwert bei $54,4\mu\text{g}/100\text{ml}$ lag. (Abb. 11)

Abbildung 11

Streuung



Neben der Einschränkung der Spezifität durch enzymatische und saure Hydrolyse stören bei der Direktbestimmungsmethode noch andere Faktoren. Bei Zugabe der Phenol- und Hypochloritreagenzien zu dem Standardgemisch (Standard + TCE im Verhältnis 1:1) ist

das Gemisch zuerst wasserhell, dann entwickelt sich langsam die reine blaue Farbe der Indophenolverbindung. Gibt man Phenol- und Hypochloritreagens zum TCE-Plasmagemisch, so erfolgt sofort ein geringer Farbumschlag: die Lösung wird schwach gelb-grün. Auch nach vollständiger Farbentwicklung des Indophenolfarbstoffs wird die Farbe nicht so klar blau wie bei den Standardlösungen, sondern behält neben der blauen Färbung einen Schimmer ins Gelb-Grün. Trotzdem läuft die im Spektralphotometer gemessene Extinktionskurve (Abb. 1) in dem normalen Meßbereich formgleich zur Standardextinktionskurve. Lediglich im Meßbereich der Wellenlänge 400 bis 520nm zeigt die Plasmaextinktionskurve höhere Werte. Es müssen also im Plasma noch Substanzen vorhanden sein, die bei der Indophenolblau-Bildung mit dem Ammoniak interferieren. Nach Stahl (43) sind dies Aminosäuren, da diese durch TCE nicht mit ausgefällt werden.

Die Wiederfindungsquote gibt das Verhältnis des errechneten zu dem gemessenen Ammoniak an und ist somit ein Hinweis auf die Spezifität der Methode. Bei den Versuchen zur Wiederfindung erzielten wir mit der Direktbestimmungsmethode einen besseren Durchschnittswert der Wiederfindungsquote (107%) als mit der Ionenaustauschermethode (86,9%). Obwohl der Mittelwert der Direktbestimmungsmethode besser war, streuten die Einzelwerte stärker. Außerdem waren die gemessenen Werte teils höher, teils niedriger als die errechnete Wiederfindungsquote. Daraus schließen wir auf verschiedene Faktoren, die bei der Direktbestimmungsmethode entweder hemmend auf die Reaktion des Ammoniaks mit den Farbreagenzien oder fördernd bei der Bildung artifiziellen Ammoniaks eingreifen können. Berthelot-hemmende Substanzen sind nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER (28) verschiedene Aminosäuren, jedoch nur, wenn die Aminosäurenkonzentration im Vergleich zur Ammoniakkonzentration hoch ist. Bilirubin, Glucosamin, Glutamin und Citrullin sollen bei den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht interferieren. (28) Die gemessenen Einzelwerte der Wiederfindung lagen bei der Ionenaustauschermethode alle unter den errechneten. (Tab. 5) Wie Abbildung 5 zeigt, gehen bei

der Adsorption an das Harz, dem Waschvorgang und der Elution 10 % des Plasmaammoniaks verloren. Da dieser Verlust bei Plasma und Standard prozentual gleich ist, brauchten wir ihn bei der Berechnung unserer gemessenen Werte nicht zu berücksichtigen. Substrahieren wir diese 10 % von den errechneten Wiederfindungswerten, so erhalten wir eine Wiederfindungsquote von 97,4 %.

R e p r o d u z i e r b a r k e i t:

Tabelle 9

Zusammenstellung der Ergebnisse beider Methoden

Standard	Standardabweichung	Ionen- austauscher ± 0,0035	Direkt- bestimmung ±0,012
Werte gesunder Versuchs- personen	Extremwerte in µg/100ml	30,2-97,4	14,6-99,4
	Mittelwerte in µg/100ml	54,4	58,7
	Standardabweichung	±15,4	±18,0
	s bei wiederholter Doppelbestimmung einer Versuchspers.	± 2,9	± 4,46
	M der Abweichung al- ler Doppelbest. in µg/100ml	± 4,85	±10,0
	Wiederfindungs- quote in %	86,9	107,0

Tabelle 9 zeigt die Untersuchungsergebnisse beider Methoden. Daraus geht hervor, daß die Blutammoniakwerte bei Gesunden mit der Ionenaustauschermethode eine größere Konstanz aufweisen als mit der Direktbestimmungsmethode: Die Standardabweichung bei allen Bestimmungen und bei wiederholten Doppelbestimmungen einer gesunden Versuchsperson sind mit der Ionenaustauschermethode geringer, die Blutammoniakwerte bei Gesunden streuen weniger als

bei der Direktbestimmungsmethode. Alle diese Untersuchungen führte der s e l b e Untersucher durch. Bei 20 gesunden Versuchspersonen führten gleichzeitig zwei Untersucher die Blutammoniakbestimmung mit der Ionenaustauschermethode durch. Die Ergebnisse hatten eine mittlere Differenz von $12,6 \mu\text{g}/100\text{ml}$. 20 Parallelbestimmungen verschiedener Untersucher ergaben bei der Direktbestimmungsmethode eine mittlere Differenz von $5,2 \mu\text{g}/100\text{ml}$. Die niedrigeren Abweichungen bei der Direktbestimmungsmethode sind durch den einfacheren Analysengang bedingt.

S c h w i e r i g k e i t s g r a d:

Bei der Direktbestimmungsmethode ist nur sorgfältiges Pipettieren notwendig. Das Pipettieren der Phenol- und Hypochlorit-reagenzien kann durch automatische Zipetten mechanisiert und erleichtert werden. Außerdem fallen durch die Mechanisierung Pipettierfehler fort. Die Phenol- und Hypochloritreagenzien müssen dann nach dem Ansetzen in die Zipetten gefüllt und in diesen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bei dieser Methode ist praktisch keine Einarbeitungszeit notwendig.

Der Schwierigkeitsgrad der Ionenaustauschermethode ist etwas größer, da beim Waschvorgang das Harz möglichst vollständig isoliert werden muß, aber kein Harz dabei verlorengehen darf. Eine geringe Einarbeitungszeit ist notwendig, außerdem muß sehr sorgfältig gearbeitet werden, um eine gute Reproduzierbarkeit zu erreichen.

C h e m i k a l i e n u n k o s t e n u n d a p p a r a t i v e r A u f w a n d:

Die Chemikalienunkosten sind bei der Direktbestimmungsmethode minimal, die der Ionenaustauschermethode etwas höher. Der apparative Aufwand ist bei beiden Methoden gering. Da die Farbentwicklung beider Methoden auch bei Zimmertemperatur durchgeführt werden kann, werden nur ein Photometer mit hinreichend

monochromatischem Licht und einer Wellenlänge oberhalb 550 Millimikron und eine Zentrifuge benötigt. Zur Bestimmung mit der Ionenaustauschermethode sind außerdem Reagenzgläser mit Schlifftrand empfehlenswert, bei der Direktbestimmungsmethode automatische Zipetten. Diese sind besonders arbeitserleichternd und zeitsparend, wenn mehrere Bestimmungen gleichzeitig durchgeführt werden.

Z e i t b e d a r f:

Der Zeitaufwand für eine einfache Bestimmung, das heißt Doppelwerte des Untersuchungsmaterials plus Bestimmung des Leerwertes und eines Standardwertes, ist für die Direktbestimmungsmethode auf Seite 49 aufgeführt, für die Ionenaustauschermethode auf Seite 48. Bei Mehrfachbestimmungen steigt der Zeitbedarf bei beiden Methoden. Bei der Direktbestimmungsmethode ist dieser Mehrbedarf an Zeit nicht erheblich, wenn automatische Zipetten benutzt werden sehr gering. Auch bei vielen gleichzeitigen Bestimmungen erreichten wir nie den steilen Anstieg des artifiziellen Ammoniaks. Bei der Ionenaustauschermethode steigt der Zeit- und Arbeitsaufwand bei Mehrfachbestimmungen erheblich, da beim Waschvorgang jedes Reagenzglas e i n z e l n geschüttelt und der Überstand abgesaugt werden muß.

Das Ansetzen der Farbreagenzien erfordert bei der Ionenaustauschermethode wegen der standardisierten Abpackung nur sehr wenig Zeit. Bei der Direktbestimmungsmethode müssen die einzelnen Reagenzien dagegen sorgfältig abgewogen werden. Da wir aber die Gläser zur Farbentwicklung 30 Minuten ins Wasserbad gaben, hatten wir währenddessen Zeit zum Ansetzen der Reagenzien und zum Reinigen der Glassachen.

R i c h t i g k e i t:

Solange der wahre Gehalt des Blutammoniaks noch fraglich ist, können wir die Richtigkeit der Bestimmungsmethoden nur im Ver-

gleich mit anderen Methoden prüfen. Ein Vergleich der Werte beider Methoden bei gesunden Versuchspersonen zeigt die gleiche Größenordnung. Ein Vergleich mit Normalwerten aus der Literatur zeigt im wesentlichen die gleiche Größenordnung wie die von uns erhaltenen Mittelwerte (Tab. 10). CASTELL (4) gibt allerdings bei der von ihm angewandten Mikrodiffusionsmethode einen Normalbereich an, der 100 % höher liegt als der unserer eigenen Untersuchungen. FENTON (9) fand mit der in Kälte durchgeführten Ionenaustauschermethode Normalwerte, die ca. 30% niedriger lagen als die anderer Untersucher der Ionenaustauschermethode und als unsere eigenen Normalwerte.

Tabelle 10

Untersucher	Methode	Material	NH ₃ -Konzentration µg/100ml Mittel u. Streuung		
Konitzer u.	Direktbestimmung	Blut	112	±	22
Voigt	Phenol/Hypochlorit	Plasma	75	±	28
Müller-Beissen- hirtz/ Keller	Direktb. im TCE-Extr.	Plasma	56	±	13,34
	Phenol/Hypochlorit	(ven.)			
Müller-Beissen- hirtz/ Keller	Direktb. in TCE-Na	Plasma	81	±	17
	Phenol/Hypochlorit	(kapil.)			
eigene Unter- suchungen	Direktb. im TCE-Extr.	Plasma	58,7	±	18
	Phenol/Hypochlorit	(ven.)			
Fenton	Ionenaustauscher	Plasma	16,2		
	Phenol/Hypochlorit	(ven.)	Extremw.	3-27,5	
Dienst and Morris	Ionenaustauscher	Plasma	63	±	10
	Phenol/Hypochlorit	(ven.)			
Hutchinson and Labby	Ionenaustauscher	Plasma	39	±	11
	Nesslers-Reagens	(ven.)			
eigene Unter- suchungen	Ionenaustauscher	Plasma	54,4	±	15,4
	Phenol/Hypochlorit	(ven.)			
Martini und Wiebel	Mikrodif.n.Conway	Blut	53	±	13
	Phenol/Hypochlorit				
Nathan and Rodkey	Mikrodif.n.Conway	Plasma	77	±	28
	Ninhydrin-Reaktion	(ven.)			
Ternberg et al.	Mikrodif.	Blut	94	±	26,6
	Phenol/Hypochlorit	(ven.)			
Strohmeyer et al.	Mikrodif.n.Conway	Blut	52	±	18
	Phenol/Hypochlorit	(ven.)			

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Direktbestimmungsmethode für den klinischen Routinebetrieb geeigneter ist als die Ionenaustauschermethode. Die geringere Spezifität und die größeren Standardabweichungen der Direktbestimmungsmethode liegen in einem Bereich, der in der Klinik durchaus noch toleriert werden kann. Ein Vergleich pathologischer Ammoniakwerte (Tab. 11) zeigt bei beiden Methoden die gleiche Größenordnung. Arbeits- und zeitmäßig stellt die Direktbestimmungsmethode zur Zeit die beste Lösung dar, vor allem steigt bei Mehrfachbestimmungen der Arbeits- und Zeitaufwand nicht wesentlich.

Die Ionenaustauschermethode ist dagegen wegen ihrer größeren Spezifität und Reproduzierbarkeit für wissenschaftliche Untersuchungen geeigneter.

Tabelle 11

Vergleich pathologischer Ammoniakwerte

Patient	Diagnose	Direktb. NH ₃ -Nug/100ml	Ionenast. NH ₃ -Nug/100ml	Tag nach stat. Auf- nahme	nüchtern
D.	mittelhöckrige komplette Leberzirrhose mit porta- lem Hypertonus (Lap.) und geringer Aszites- bildung; Ikterus	105,0 81,5 95,5	102,0 89,5 91,5	2. 3. 4.	+ + +
K.	Leberci.; Ikterus; Aszites	220,0	209,0	1.	=
W.	Leberzirrhose	120,0 85,0	106,0 86,5	2. 4.	+ -
S.	Leberci.; Oesophagusvari- zen; Aszites Nach Anlegen einer Porto- -cavalen End-zu-Seit Anastomose	59,0 210,0	68,0 216,0	10. 17.	+ +
F.	Verdacht auf Coma Hepati- -cum; Leberzirrhose; Diabetes mellitus	220,0 125,0	192,0 110,0	2. 4.	- +
S.	Leberzirrhose; Praecoma hepaticum -	211,0 226,0 103,4	197,0 214,0 104,0	3. 4. 11.	+ + +

Zusammenfassung

Zwei verschiedene Analysengänge wurden zur Bestimmung des Blutammoniaks in je 75 Bestimmungen auf ihre routinemäßige Verwendbarkeit unter gleichen Versuchsbedingungen untersucht.

Es hat sich hierbei herausgestellt, daß die Normalwerte beider Methoden die gleiche Größenordnung zeigten. Die Werte bei Patienten mit Leberparenchymschaden lagen bei beiden Untersuchungsmethoden ebenfalls in der gleichen Größenordnung.

Die Ionenaustauschermethode zeigte eine größere Spezifität und Reproduzierbarkeit.

Die geringere Spezifität und Reproduzierbarkeit der Direktbestimmungsmethode sind für klinische Belange durchaus noch tolerierbar. Für den klinischen Routinebetrieb, in dem mehrere Untersuchungen gleichzeitig vorgenommen werden und verschiedene Untersucher die Bestimmung durchführen, ist die Direktbestimmungsmethode wegen ihres schnellen, sehr einfachen Analysenganges geeigneter als die Ionenaustauschermethode.

Literaturverzeichnis

1. Ballot, A.F.K.B.
Steendijk, C. Ammonia determination in a trichloroacetic acid blood filtrate after microdiffusion with the acid of the rubazonic acid reaction
Clin.Chim.Acta 12, 55 (1965)
2. Bessman, A.N.
Hawkins, R. The relative effects of enterically administered plasma and packed cells on circulating blood ammonia
Gastroenterology 45, 368 (1963)
3. Büttner, H. Die Aufgabe des klinischen Laboratoriums
Internist(Berl.) 4, 517 (1963)
4. Castell, D.O. The ammonia tolerance test: an index of portal hypertension
Gastroenterology 49, 539 (1965)
5. Conn, H.O.
Kuljian, A.A. The preservation of blood by rapid freezing for subsequent determination of blood ammonia
J.Lab.Clin.Med. 63, 1033 (1964)
6. Conway, E.J. Microdiffusion analysis and volumetric error
4th revised edit. London
Crosby Lockwood & Ltd. (1957)
7. Dienst, S.G. An ion exchange method for plasma ammonia concentration
J.Lab.Clin.Med. 58, 149 (1961)
8. Egense, J. Ammonia and hepatic coma
Acta med.scand. 173, 7 (1963)
9. Fenton, J.C.B. The estimation of plasma ammonia by ion exchange
Clin.Chim.Acta 7, 163 (1962)
10. Forman, D.T. Rapid determination of plasma ammonia by an ion exchange technique
Clin.Chem. 8, 432 (1962)
- 11a. Gros, H. Die moderne Therapie chronischer Hepatopathien
Dtsch.med.J. 12, 221 (1961)
- 11b. Gros, H. Die Therapie des Leberkomas
Die Therapiewoche 14, 18 948 (1964)

12. Haefely, W.
Hürlimann, A.
Staub, H. Zur Pathophysiologie des Ammoniakstoff-
wechsels. Bedeutung der bakteriellen Urease-
wirkung im Intestinaltrakt für die Hyper-
ammoniaemie bei portocavalem Shunt
Med.Klin. 57, 696 (1962)
13. Hahn, M.
Massen, O.
Nencki, M.
Pawlow, J. Die Eck'sche Fistel zwischen der mittleren
Hohlvene und der Pfortader und ihre Folgen
für den Organismus
Arch.J.Exp.Path.u.Pharm. 32, 161 (1893)
14. Hegglin, R. In Hegglin, R.
"Differentialdiagnose innerer Krankheiten" 882
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1966
15. Hutchinson, J.H.
Labby, D.H. New Method for microdetermination of blood
ammonia by use of cation exchange resin
J.Lab.Clin.Med. 60, 170 (1962)
16. Keller, H.
Müller-Beissen-
hirtz, W.
Neumann, E. Eine Methode zur Ammoniakbestimmung im
Kapillarblut
Aus dem Klinisch-Chemischen Institut des
Katharinenhospitals Stuttgart
Unveröffentlichte Mitteilung 1967
17. Kirsten, E.
Gerez, C.
Kirsten, R. Eine enzymatische Mikrobestimmung des
Ammoniaks, geeignet für Extrakte tierischer
Gewebe und Flüssigkeiten.
Bestimmung des NH_4^+ -Gehaltes im Blut
Bioch.Zschr. 337, 312 (1963)
18. Konitzer, K.
Voigt, S. Direktbestimmung von Ammonium in Blut- und
Gewebsextrakten mit der Phenol-Hypochlorit-
reaktion
Clin.Chim.Acta 8, 5 (1963)
19. Krebs, H.A. Untersuchungen über den Stoffwechsel der
Aminosäuren
Zsch.f.Physiol. 217, 191 (1933)
20. Krebs, H.A.
Henseleit, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung
im Tierkörper
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für
Physiologische Chemie 210, 33 (1932)
- 21a. Kühn, H.A. In Keiderling, W.
"Beiträge zur inneren Medizin" 603
F.K.Schattauer-Verlag, Stuttgart 1964
- 21b. Kühn, H.A. Neue Wege zur Behandlung des Leberkomas
Dtsch.med.Wschr. 851, 393 (1960)

22. Kühn, H.A.
Baur, H. Vergleichende Therapie der akuten Virus-hepatitis
Dtsch.med.Wschr. 852, 1956 (1960)
23. Löffler, W. Desaminierung und Harnstoffbildung im Tierkörper
Bioch.Zschr. 85, 230 (1918)
24. Mannig, R.T. A nomogramm für estimation of pNH_3
J.Lab.Clin.Med. 63, 297 (1964)
25. Martini, G.A. Die Bedeutung des Blutammoniaks für die Entstehung des Leberkomas
Dtsch.med.Wschr. 86, 1351 (1961)
26. Martini, G.A.
Wiebel, J.P. Die Ammoniakbestimmung im Blut zur Differentialdiagnose akuter Blutungen im oberen Verdauungskanal
Med.Klin. 59, 618 (1964)
27. Miller, G.E.
Rice, J.D. Determination of ammonia nitrogen in plasma by means of a simple ion exchange method
Am.J.Clin.Path. 39, 97 (1963)
28. Müller-Beissenhirtz, W.
Keller, H. Zur Bestimmung des Blutammoniaks
Klin.Wschr. Jg. 43, Heft 1, 43 (1965)
29. Mütting, D.
Reikowski, H.
Eschrich, W.
Matzander, U. Zur Therapie des Coma hepaticum
Med. Welt. 17: 1814 (1966)
30. Mütting, D.
Reikowski, J.
Reikowski, H. Über die Wirkung von Neomycin auf Blut-ammoniak, freie Aminosäuren und freie Phenole im Serum und Urin bei Leberzirrhose
Med. Welt, Mai 1968, 1235
31. Nathan, D.G.
Rodkey, F.L. A colorimetric procedure for the determination of blood ammonia
J.Lab.Clin.Med. 49, 779. (1957)
32. Nordmann, R. Zur Therapie der Hyperammoniaemie
Anaesthesiologie und Wiederbelebung 13:107 (1966)
33. O'Donnell, J.F.
Schiff, A.
Piller, M. Acid-soluble nucleotides in human liver
J.Lab.Clin.Med. 59, 963 (1955)

34. Orloff, M.J.
Wall, M.H.
Hickmann, E.B.
Neesby, T. Influence of stomal size of portocaval
shunts on peripheral blood ammonia
levels
Ann. Surg. 158: 172 (1963)
35. Derea, V.D.
Nelson, R.S. Blood ammonia levels in primary and
metastatic cancer of the liver
Clin. Chim. Acta. 9, 13 (1964)
36. Perret, A.
Montani, S.
Magenat, P. Hyperammoniémie de l'insuffisance
respiratoire
Helv. med. Acta 4/5: 506 (1964)
37. Ratner, S. Urea synthesis and metabolism of arginine
and citrulline
Adv. Enzymol. 15, 319 (1954)
38. Reardon, J.
Foreman, J.A.
Searcy, R.L. New reactans for the colorimetric
determinations of ammonia
Clin. Chim. Acta 14, 403 (1966)
39. Schröder, W. von Über die Bildungsstätte des Harnstoffs
Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 15, 364 (1882)
40. Seligson, D.
Hirahara, K. The measurement of ammonia in whole
blood, erythrocytes and plasma
J. Lab. Clin. Med. 49, 962 (1957)
41. Seligson, D.
Seligson, H. A microdiffusion method for the deter-
mination of nitrogen liberated as ammonia
J. Lab. Clin. Med. 38, 324 (1951)
42. Slyke, B.D. von
Hiller, H. Determination of ammonia in blood
J. biol. Chem. 102, 499 (1933)
43. Stahl, J. Studies of the blood ammonia in liver
disease
Ann. intern. Med. 58, 1 (1963)
44. Stone, W.E. A new colorimetric reagent for micro-
determination of ammonia
Proc. Soc. exp. Biol. 93, 589 (1956)
45. Strohmeier, G.
Schneider, K.
Martini, G.A. Das Verhältnis von Blutammoniak zu
Ketosauren bei chronisch Leberkranken
Klin. Wschr. Jg. 41, 413 (1963)

46. Teorell, T. Eine neue Methode zur titrimetrischen Bestimmung kleinster Mengen Ammoniak
Bioch.Zschr. 248, 246 (1932)
47. Ternberg, J.L.
Hershey, F.B. Colorimetric determination of blood ammonia
J.Lab.Clin.Med. 56, 766 (1960)
48. Tobe, B.A. The identification and pathological significance of the two components of the blood ammonia level
Gastroenterology 42, 469 (1962)
49. Wachsmuth, E.D.
Fritze, J. Eine einfache Methode zur Bestimmung von Ammoniak in nicht enteweißter Lösung
Klin.Wschr. Jg.43 Heft 1, 53 (1965)
50. Warren, K.
Nathan, D.G. Passage of ammonia across blood-brain barrier and its relation to blood pH
J.Clin.Invest. 37, 1724 (1958)
51. Weller, H. Die Verwendung der Berthelotschen Reaktion auf Ammoniak in der klinischen Chemie
Röntgen- u.Lab.-Prax. 15, L77, L142 (1962)
52. Zöllner, N.
Birk, P. Die Bestimmung des Blutammoniaks und ihre Ergebnisse bei Leberkrankheiten
Klin.Wschr. Jg.36, Heft 12 Juni 1958

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle Herrn Professor Dr. med. H.A. K ü h n für die freundliche Überlassung des Themas meinen verbindlichen Dank auszusprechen.

Gleichfalls danke ich Herrn Dr. med. H. L i e h r für die wertvollen Anregungen zur Durchführung der Versuche und für die Beratung bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 31.12.1941 wurde ich als erstes Kind des Arztes Wilhelm Lauer und seiner Ehefrau Helene, geb. Schwerdtfeger, in Kassel geboren. Infolge des Kriegsgeschehens verlebte ich meine ersten Lebensjahre an verschiedenen Orten Nordhessens.

Im Januar 1948 wurde ich in Oberelsungen, Kreis Wolfhagen, eingeschult. Im Herbst 1948 verzogen meine Eltern nach Wiesbaden, wo mein Vater sich als praktischer Arzt niederließ.

Ab Ostern 1952 besuchte ich in Wiesbaden die Helene Lange Schule, Gymnasium für Mädchen, in deren naturwissenschaftlichem Zweig ich am 18.2.1961 mein Abitur ablegte.

Nach einem Jahr Ausbildung an der Landwirtschaftlichen Frauenschule in Bad Weilbach, begann ich im Sommersemester 1962 das Medizinstudium in Heidelberg. Ich legte dort am 29.4.1963 das Vorphysikum und am 10. 4. 1965 das Physikum ab. Nach zwei klinischen Semestern in Heidelberg immatrikulierte ich mich an der Justus Liebig-Universität in Gießen und erhielt dort das Thema meiner Doktorarbeit von Herrn Professor Dr. med. H. Kühn. Nach zwei Semestern kehrte ich an die Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg zurück und bestand dort am 18.12.1968 mein Staatsexamen.

Meine Medizinalassistentenzeit absolviere ich seit dem 1.3.1969 an den Kliniken der Stadt Wiesbaden.

Am 19.8.1969 verheiratete ich mich mit Herrn Diplomingenieur Artur Hoebel

Renate Hoebel

geb. Lauer

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641-77449